

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
31 décembre 2003 (31.12.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/000887 A1(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :C08B 37/00, C08G 65/00,  
81/00, A61K 38/21, 47/48, C08G 65/32

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/001860

(22) Date de dépôt international : 18 juin 2003 (18.06.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

02/07562 19 juin 2002 (19.06.2002) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : COM-  
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR];  
31/33, rue de la Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR).

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). UNIVERSITE PARIS SUD [FR/FR]; Avenue George Clémenceau, F-91405 Orsay (FR).

(72) Inventeurs; et

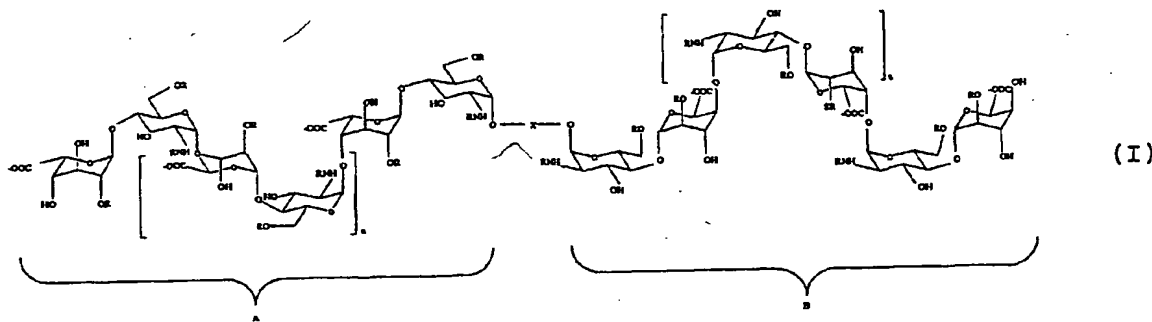
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BON-  
NAFFE, David [FR/FR]; 4, rue des Tournelles, F-75004 Paris (FR). LUBINEAU, André [FR/FR]; 2, allée des Près, F-91410 Dourdan (FR). ALAIS, Jocelyne [FR/FR]; 5, rue Bois Michel Pierre, F-91440 Bures sur Yvette (FR). GAVARD, Olivier [FR/BE]; 28, boulevard G. Van Haelen, B-1190 Bruxelles (BE). DILHAS, Anna [FR/FR]; 5, rue du Général Duchesne, F-91400 Orsay (FR). LORTAT-JACOB, Hugues [FR/FR]; 105, chemin du Crêt de Chaume, F-38330 Saint Ismier (FR).

(74) Mandataire : AUDIER, Philippe; Brevatome, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: COMPOUNDS THAT BIND TO THE INTERFERON-GAMMA, PREPARATION METHOD THEREOF AND MEDICAMENTS CONTAINING SAME

(54) Titre : COMPOSES SE LIANT A L'INTERFERON-GAMMA, LEUR PROCÉDE DE PREPARATION, ET MEDICAMENTS LES CONTENANT

(57) Abstract: The invention relates to a compound that can bind to the interferon-gamma (IFN $\gamma$ ), which is selected from molecules having formula (I), in which X denotes a divalent spacer group having a sufficient length to enable each of the two oligosaccharide fragments A and B to bind to one of the peptide sequences 125 to 143 at the C-terminal ends of a homodimer of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and n denotes an integer of between 0 and 10, e.g. equal to 0, 1, 2, 3, 4 or 5, and each R denotes independently a hydrogen atom, an SO<sub>3</sub><sup>-</sup> group, or phosphate, on the condition that no SO<sub>3</sub><sup>-</sup> group is located in position 3 of the glucosamine units of the compound (I). The invention also relates to the method of preparing the compounds, the complexes formed by the aforementioned compounds and the interferon-gamma and medicaments containing said compounds or complexes.(57) Abrégé : Composé susceptible de se lier à l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) choisi parmi les molécules répondant à la formule (I) suivante: dans laquelle X est un groupe espaceur divalent d'une longueur suffisante pour permettre aux deux fragments oligosaccharides A et B de se lier chacun à l'une des séquences peptidiques 125 à 143 des extrémités C-terminales d'un homodimère d'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et n représente un nombre entier de 0 à 10, par exemple égal à 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 et chaque R représente indépendamment un atome d'hydrogène un groupe SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ou phosphate, à la condition qu'aucun groupe SO<sub>3</sub><sup>-</sup> ne se trouve en position 3 des unités glucosamines du composé (I). L'invention concerne également le procédé de préparation de ces composés, les complexes formés par ces composés et l'interféron gamma, et les médicaments comprenant ces composés ou complexes.

d'un grand nombre de molécules de l'espace péricellulaire, notamment les molécules de surface cellulaire, ainsi qu'un grand nombre de composés de la matrice extracellulaire. L'IFN $\gamma$  joue donc un rôle important, entre autres, dans les  
5 mécanismes de défense, tels que la réponse immune et l'inflammation, dans la croissance cellulaire et la différenciation, dans les phénomènes d'adhésion et de migration cellulaire (1).

Les thérapeutiques liées aux cytokines, telles  
10 que l'IFN $\gamma$ , consistent soit à administrer ce type de molécule, soit, au contraire, à inhiber leurs activités.

Ainsi, les activités multiples mentionnées plus haut et observées in vitro ont, elles, donné lieu à de nombreux essais cliniques dans des pathologies variées,  
15 telles que le cancer (2), la granulomatose chronique (3), l'arthrite rhumatoïde (4), les infections bactériennes ou parasitaires (5), les hépatites (6) ou les maladies fibroprolifératives, comme la sclérose systémique (7). Néanmoins, l'efficacité clinique de l'IFN $\gamma$  n'a pas été  
20 clairement démontrée jusqu'à présent, et son indication principale reste limitée à une maladie rare : la granulomatose chronique (8).

A l'inverse dans certaines pathologies inflammatoires ou auto-immunes (9), ou pour diminuer le  
25 rejet de la greffe après transplantation, il peut être intéressant d'inhiber l'activité biologique de la cytokine. Pour cela, des anticorps ou du récepteur sous forme soluble ont été développés et testés sur des modèles animaux (10).

La mise au point d'une thérapie basée sur  
30 l'utilisation de l'IFN $\gamma$  pose des problèmes techniques

importants liés en particulier à sa faible demi-vie in vivo et à sa faible biodisponibilité.

L'obstacle de la faible biodisponibilité de l'IFN $\gamma$  peut être surmonté en ayant recours à des méthodes d'application locale, mais ces méthodes ne permettent pas d'atteindre les organes profonds par voie systémique, de plus, le problème de la faible demi-vie in vivo demeure entier.

A titre d'exemple, de telles méthodes d'administration locale de l'IFN $\gamma$  : on peut citer l'inhalation de l'IFN $\gamma$  pour le traitement du cancer du poumon, sa nébulisation dans le traitement de la réponse allergique, ou son encapsulation dans des liposomes.

L'étude de la réponse cellulaire à l'IFN $\gamma$  peut permettre d'expliquer les difficultés de l'utilisation thérapeutique.

En effet, la réponse cellulaire à l'IFN $\gamma$  dépend du type de cellules stimulées, de la concentration locale de l'IFN $\gamma$  et des autres facteurs de régulation auxquels la cellule est exposée de façon concomitante.

En particulier, il a été démontré que, indépendamment de son récepteur cellulaire, l'IFN $\gamma$  était également capable de se fixer à des oligosaccharides de type héparine ou héparanes sulfates (HS), avec une affinité importante (5 à 10 nM) (11).

In vivo, chez l'animal, l'héparane sulfate fixe effectivement l'IFN $\gamma$ , et cette interaction contrôle l'élimination plasmatique de la cytokine, son accumulation dans différents organes, et sa localisation dans les tissus.

Notamment, après une injection intraveineuse, l'IFN $\gamma$  est éliminé par un processus biexponentiel, au cours duquel 90 % de la cytokine disparaît de la circulation sanguine pendant les 5 à 10 premières minutes, avec un  
5 temps de demi-vie particulièrement court, voisin de 1 minute.

Ces résultats démontrent qu'une large proportion, à savoir environ 90 % de l'IFN $\gamma$  injecté est rapidement fixé par des molécules de type héparine/héparane sulfate,  
10 notamment à la surface de l'endothélium vasculaire (12). En outre, l'observation autoradiographique de coupes tissulaires montre que l'IFN $\gamma$  n'a pas accès de manière identique à tous les tissus.

Il s'accumule dans le foie, le rein et la rate,  
15 mais, par exemple, pas dans le muscle. De plus, au sein d'un même tissu, il n'est pas réparti de façon homogène et se trouve concentré dans les zones riches en héparane sulfate. De telles concentrations locales sont détectées, par exemple, dans les sinusoides hépatiques - à la surface  
20 des hépatocytes et des cellules endothéliales -, dans les glomérules rénaux ou dans la pulpe rouge de la rate (13).

Il apparaît donc, de façon claire, que l'interaction de la cytokine avec les HS limite de façon considérable l'accessibilité à différents compartiments in  
25 vivo, et les difficultés rencontrées au cours de l'utilisation thérapeutique de l'IFN $\gamma$  (14) sont vraisemblablement liées en partie à ces interactions. Ces travaux montrent également que les héparines sulfates sont responsables d'accumulation locales importantes de cytokine  
30 dans les tissus. Enfin, il a été montré également qu'in

vivo, l'IFN $\gamma$ , seul, est rapidement inactivé par dégradation protéolytique de son extrémité C-terminale (12).

Afin d'apporter une solution aux problèmes mentionnés plus haut, il a été proposé d'associer l'IFN $\gamma$  à une molécule d'héparine. Cette association permet une élimination plasmatique beaucoup plus lente et une distribution tissulaire plus large de la cytokine et induit, en outre, une augmentation de l'activité par un mécanisme de protection du domaine C-terminal, contre les dégradations protéolytiques.

Par ailleurs, l'injection d'héparine seule permet de déplacer la cytokine accumulée dans les tissus par les HS endogènes, et donc de réduire ou supprimer son activité.

Cependant, l'utilisation d'une molécule d'héparine pour protéger l'IFN $\gamma$  et augmenter sa biodisponibilité, ou au contraire pour en supprimer l'action locale, soulève des difficultés qui proviennent des activités de l'héparine, elle-même, et, en particulier, de ses propriétés anticoagulantes.

Sur les héparane sulfates (HS), a été caractérisé le site d'interaction pour l'IFN $\gamma$ . Il est constitué de domaines octasaccharidiques hautement sulfatés séparés par un domaine plus étendu de 7 kD, moins sulfaté.

La figure 1 montre un complexe dimère d'IFN $\gamma$  et d'héparane sulfate. Les deux domaines octasaccharidiques sont représentés par des traits gras sur la figure 1.

Seuls les domaines octasaccharidiques se lient à la forme dimérique de l'IFN $\gamma$ , le domaine central faisant un pont entre les deux extrémités.

Le document FR-A-2 736 832 (WO-A-97/03700) décrit un agent modulateur de l'activité de l'interféron- $\gamma$

comprenant un groupement de formule A-X-B, dans laquelle A et B représentent indépendamment un groupe oligosaccharidique portant une charge anionique suffisante, par exemple, sous la forme de groupes sulfate pour conférer  
5 audit groupe oligosaccharidique une affinité pour une partie de l'extrémité C-terminale de l'interféron- $\gamma$  humain contenant la séquence peptidique 125-131, et X est un bras espaceur de longueur suffisante pour permettre aux groupes A et B de se lier chacun à l'une desdites séquences  
10 peptidiques des extrémités C-terminales d'un homodimère d'interféron- $\gamma$ . Le composé décrit dans ce document présente les inconvénients suivants :

Les molécules désignées par A et B sont des fragments de dépolymérisation d'héparine ou d'héparane  
15 sulfate. On peut rappeler ici que ces molécules sont caractérisées par une très grande hétérogénéité structurale, et qu'il n'existe pas de procédé pour obtenir des molécules de ce type de structure définie, à partir de sources naturelles. Le composé décrit dans ce document  
20 représente donc en fait un mélange de molécules de structures variées. De même pour le segment X qui, selon les cas, peut aussi être un fragment de dépolymérisation d'héparane sulfate.

Une telle molécule n'a pas nécessairement de  
25 symétrie C<sub>2</sub>, (les fragments A, X et B sont "en lignes", ou orientés dans le même sens, ou encore disposés de façon "parallèles") et ne respecte donc pas la symétrie de la protéine sur laquelle elle est censée se lier.

Par ailleurs, ces molécules sont d'origine  
30 animale et ont l'inconvénient de véhiculer des agents infectieux transmissibles éventuels.

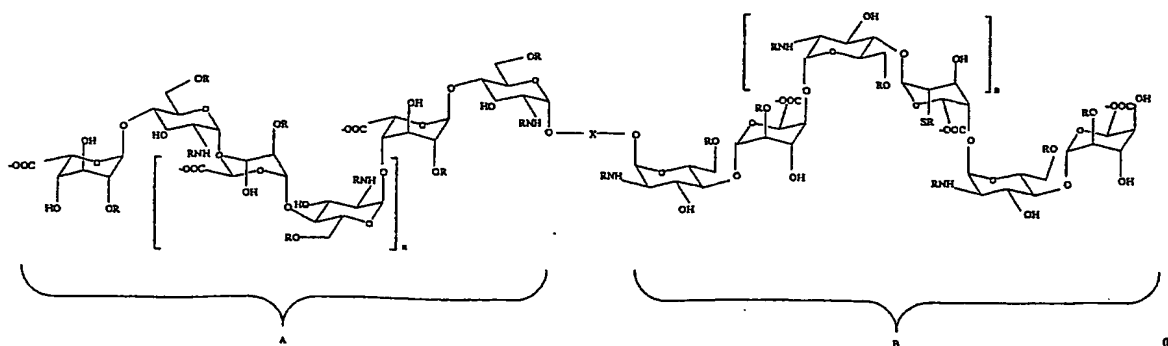
Il existe donc un besoin pour une molécule qui, liée à l'IFN $\gamma$ , permette, entre autres, de protéger celui-ci contre toute dégradation, augmente sa biodisponibilité, ainsi que sa durée de demi-vie, ou, capable de déplacer l'IFN $\gamma$  accumulé par les héparanes sulfates dans les tissus.

En d'autres termes, il existe un besoin pour une molécule qui, associée à l'IFN $\gamma$ , ait une action sensiblement analogue à celle de l'héparine, sans présenter les inconvénients liés à celle-ci.

Le but de l'invention est de fournir une molécule susceptible de se lier à l'IFN $\gamma$ , qui réponde, entre autres, aux besoins indiqués ci-dessus.

Le but de l'invention est encore de fournir une molécule susceptible de se lier à l'IFN $\gamma$ , qui ne présente pas les inconvénients, limitations, défauts et désavantages des molécules analogues de l'art antérieur, en particulier l'héparine et qui résolve les problèmes de l'art antérieur.

Ce but et d'autres encore sont atteints, conformément à l'invention, en fournissant un composé susceptible de se lier à l'interféron- $\gamma$  IFN $\gamma$  répondant à la formule (I) suivante :



dans laquelle X est un groupe espaceur divalent d'une longueur suffisante pour permettre aux deux fragments oligosaccharidiques A et B de se lier chacun à l'une des séquences peptidiques 125 à 143 des extrémités C-terminales d'un homodimère d'interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), n représente un nombre entier de 0 à 10, par exemple et égal à 0, 1, 2, 3, 4, ou 5 et chaque R représente indépendamment un atome d'hydrogène, un groupe  $\text{SO}_3^-$ , ou un groupe phosphate, à la condition qu'aucun groupe  $\text{SO}_3^-$  ne se trouve en position 3 des unités glucosamine du composé (I).

De préférence, tous les R représentent un groupe  $\text{SO}_3^-$  ou tous les groupes R représentent un groupe phosphate.

La molécule selon l'invention est nouvelle. Elle n'est identique à aucune molécule naturelle, ni à aucune des molécules synthétisées dans l'art antérieur et notamment dans la demande FR-A-2 736 832 (WO-A-97/03700).

En effet, la molécule selon l'invention présente une structure spécifique due, tout d'abord, au fait que les deux groupements oligosaccharidiques, placés de part et d'autre du groupe espaceur X, sont dans une disposition que l'on peut qualifier de « symétrique » ou « antiparallèle » par rapport au bras espaceur, alors que aussi bien dans les molécules naturelles d'héparine et d'héparane sulfate, que dans les héparines synthétiques et dans les molécules similaires décrite dans l'art antérieur, les deux groupements oligosaccharidiques sont dans une disposition « parallèle » ou « asymétrique ». Ces molécules ne respectent donc pas la symétrie de la protéine sur laquelle elles sont susceptibles de se lier.

En d'autres termes, les molécules naturelles et les molécules de l'art antérieur, qu'il s'agisse de

l'héparine, de l'héparane sulfate, ou de molécules analogues à celles-ci sont complètement, totalement asymétriques, c'est-à-dire qu'elles se présentent sous une forme de type « 1212 », alors que les molécules de l'invention sont sous une forme antiparallèle de type « 1221 », c'est-à-dire ayant une symétrie de type C2.

Par ailleurs, les molécules de l'invention se distinguent fondamentalement des molécules naturelles et des molécules de l'art antérieur par une autre caractéristique structurelle essentielle en ce sens que les molécules selon l'invention ne comportent pas de groupe sulfate en position 3 des unités glucosamine.

Du fait que ce groupe sulfate est responsable par une part prépondérante de l'activité anticoagulante de l'héparine, les molécules selon l'invention ne présentent donc pas l'un des inconvénients principaux des molécules de l'art antérieur lié à leur activité anticoagulante.

La molécule selon l'invention, qui peut être définie comme étant un « même structural » de l'héparane sulfate ou de l'héparine, dans lequel des oligosaccharides de type héparine sont liés par un espaceur hydrophile (X) de longueur modulable, se lie spécifiquement à l'IFN $\gamma$  à la manière des HS.

Le composé selon l'invention possède donc, et même au-delà, toutes les propriétés avantageuses de l'héparine : à savoir, entre autre, le fait de protéger la molécule d'IFN $\gamma$  contre les attaques des protéases, l'augmentation de la biodisponibilité de l'IFN $\gamma$ , la capacité de dissocier, par compétition, un complexe IFN $\gamma$ /héparane sulfate, sans en présenter l'inconvénient essentiel : à savoir, l'activité anticoagulante.

Les molécules selon l'invention, enfin, sont des molécules entièrement synthétiques, au contraire des molécules de l'art antérieur, représenté, par exemple, par le document FR-A-2 736 832, dans lequel les fragments  
5 « terminaux » oligosaccharides sont d'origine naturelle, de même dans la plupart des cas, que le bras espaceur. On a déjà décrit plus haut les inconvénients présentés par les molécules du document FR-A-2 736 832 en particulier en ce qui concerne l'origine naturelle, animale des fragments qui  
10 les constituent.

Les molécules selon l'invention, du fait de leur structure spécifique, s'avèrent donc résoudre les problèmes des molécules utilisées aux mêmes fins dans l'art antérieur.

15           Avantageusement, le groupe espaceur a une longueur de 15 à 150 Å, de préférence de 33 à 50 Å.

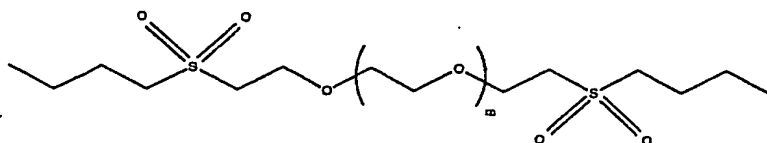
L'affinité pour la cytokine est optimale pour une longueur de 33 à 50, par exemple de 50 Å.

Généralement, le groupe espaceur est constitué  
20 par une chaîne carbonée, de préférence de 1 à 120 C, dont un ou plusieurs des atomes de carbone sont éventuellement remplacés par un hétéroatome choisi parmi N, S, P et O, un groupe SO<sub>2</sub>, ou un groupe aryle, ladite chaîne carbonée portant, en outre, éventuellement un ou plusieurs groupes  
25 anioniques choisis de préférence parmi les groupes sulfates, phosphates et les groupes carboxyliques, etc..

Avantageusement, et en particulier du fait du procédé mis en œuvre pour synthétiser les composés selon l'invention, le groupe espaceur X est issu d'un polyglycol  
30 choisi, de préférence, parmi les poly(alkylène glycol) dont

le groupe alkylène comprend de 1 à 4 C, tel que le poly(éthylène glycol).

Ainsi, le groupe espaceur pourra répondre à la

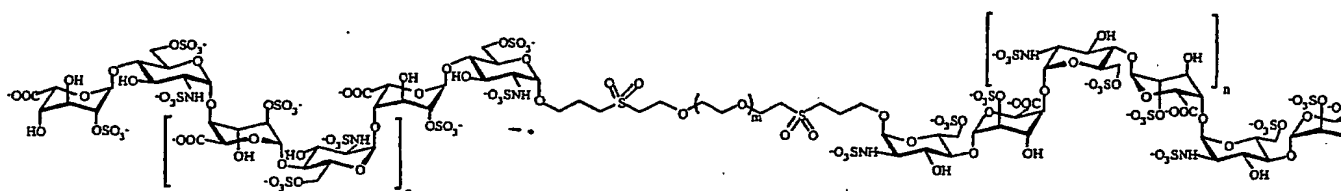


formule :

5

dans laquelle m est généralement un nombre entier de 5 à 32.

Et les composés selon l'invention répondront, ainsi de préférence, à la formule (II) suivante :



(II)

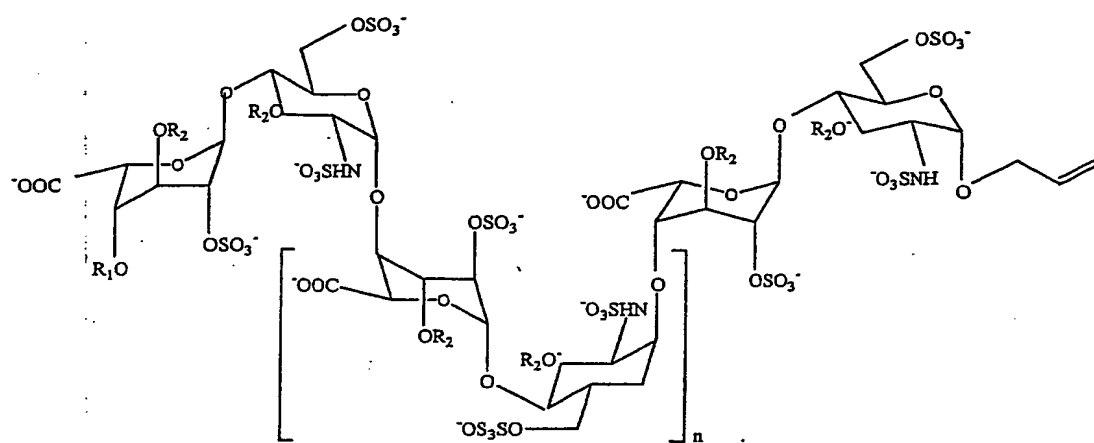
15 dans laquelle n et m ont la signification déjà donnée plus haut.

Les composés de formule (II), particulièrement préférés, sont ceux dans lesquels n = 0 et m = 5 (IIa) ; n = 0 et m = 10 (IIb) ; n = 0 et m = 32 (IIc) ; n = 1 et m = 5 (IIId) ; n = 1 et m = 10 (IIe) ; n = 1 et m = 32 (IIIf) ; n = 2 et m = 5 (IIg) ; n = 2 et m = 10 (IIh) ; n = 2 et m = 32 (IIIi).

L'invention concerne également un procédé de préparation des composés répondant à la formule (II), dans lequel on réalise le couplage radicalaire de deux composés

25

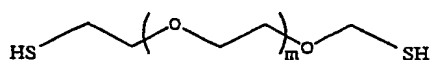
solubles dans l'eau précurseurs d'oligosaccharides de formule (III) :



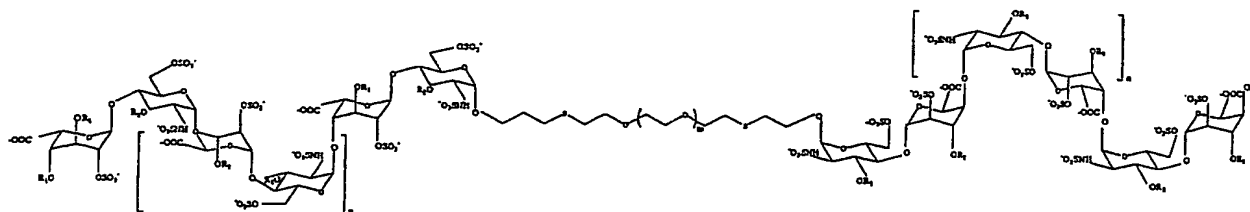
(III)

5

dans laquelle  $n$  est un nombre entier de 0 à 10 par exemple égal à 0, 1, 2, 3, 4 ou 5, et  $R_1$  et  $R_2$  représentent un groupe protecteur du groupe hydroxyle choisi, de préférence, parmi les groupes p-méthoxybenzyle et benzyle, avec un composé dithiol précurseur du groupe espaceur de formule :

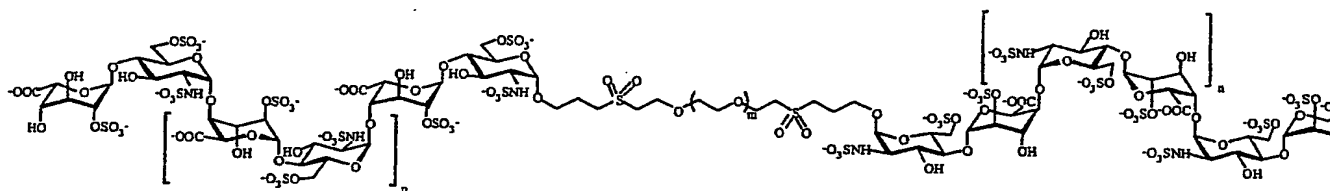


15 dans laquelle  $m$  est un nombre entier de 5 à 32, pour obtenir un composé de formule (IV) :



puis, on oxyde les fonctions thioéthers en sulfones et on réalise la déprotection finale du composé (IV) pour donner le composé final de formule (II) :

5

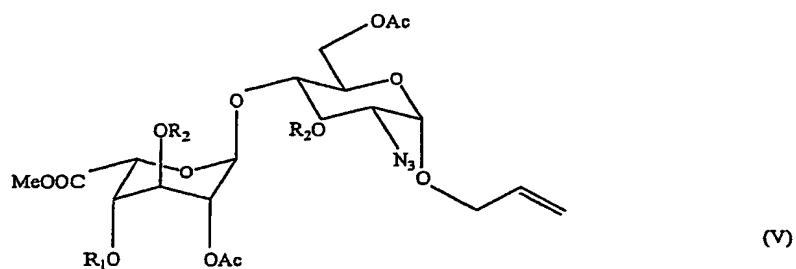


(II)

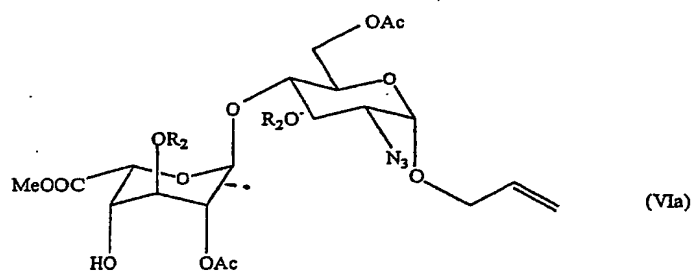
10  $R_1$  est, de préférence, un groupe p-méthoxybenzyle et  $R_2$  est un groupe benzyle.

Le composé soluble dans l'eau précurseur d'oligosaccharides dont la formule est donnée plus haut (III) est préparé par les étapes successives suivantes :

15 a) un disaccharide de formule (V) :

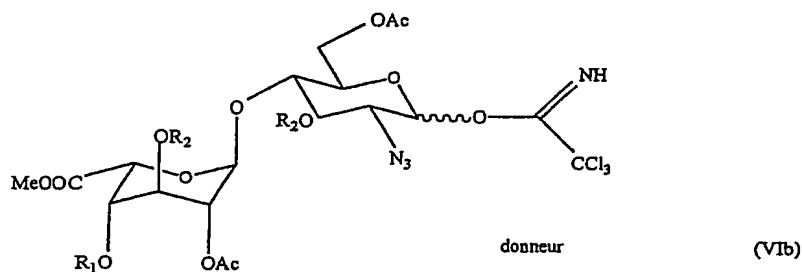


est soumis à un clivage oxydatif du groupement  $R_1$ , de  
 5 préférence, paraméthoxybenzyle, pour donner un disaccharide  
 « accepteur » de formule :



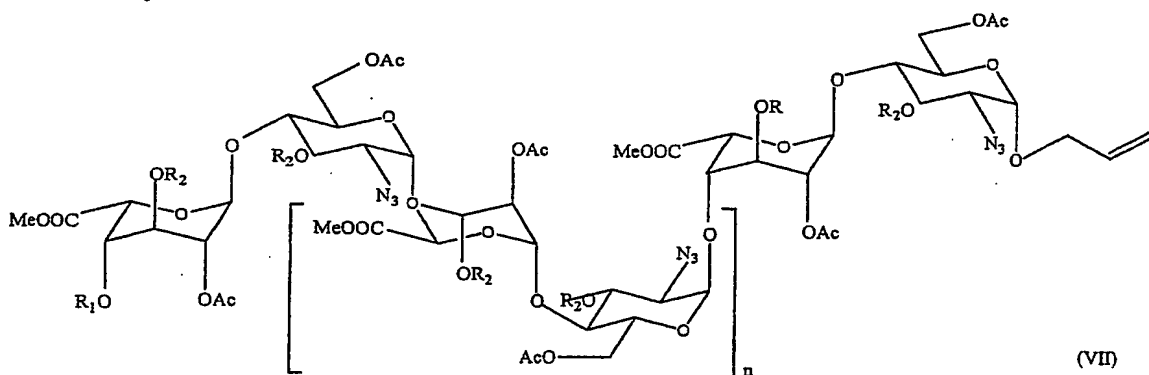
10

b) parallèlement, un disaccharide de formule (V),  
 ci-dessus, est soumis à une isomérisation du groupe allyle  
 en 1-propényle, suivi par une hydrolyse de l'éther d'énol  
 formé et une activation du groupe hydroxyle sous forme de  
 15 trichloroacétamidate pour donner un disaccharide  
 « donneur », de formule (VIb) :



c) on couple le disaccharide accepteur (VIa) et le disaccharide donneur (VIb) pour obtenir le tétrasaccharide ( $n = 0$ ) de formule (VII), avec une totale stéréospécificité alpha ;

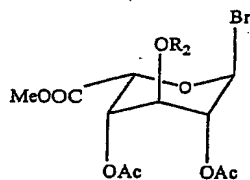
d) éventuellement, on répète les étapes a) à c), en prenant comme produit de départ pour l'étape a), le tétrasaccharide préparé en c), pour obtenir les hexa ( $n = 1$ ) et octa ( $n = 2$ ) saccharide de formule (VII) :



e) éventuellement, on répète les étapes a) à c) en prenant comme produit de départ, pour l'étape a), l'octasaccharide préparée en d), pour obtenir un hexadécasaccharide ( $n = 6$ ) de formule (VII) ;

f) on procède à la désacétylation, réduction de la fonction azide, sulfatation et saponification pour obtenir le composé soluble dans l'eau, précurseur d'oligosaccharide (III) recherché.

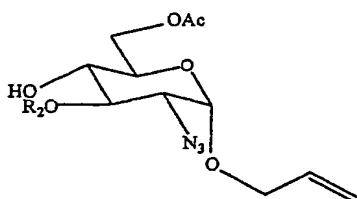
5 Le disaccharide de formule (V) est, de préférence, préparé par une réaction de couplage entre un composé de formule (VIII) :



(VIII)

10

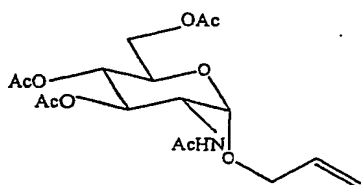
et un composé de formule (IX) :



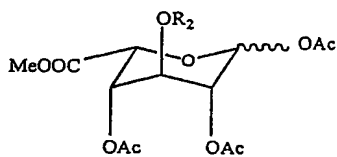
(IX)

15

Enfin, le composé de formule (IX) est préparé à partir du composé de formule (X) et le composé de formule (VIII) est préparé à partir du composé de formule (XI) :



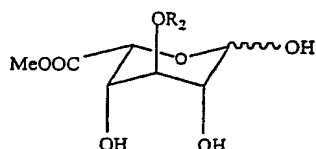
(X)



(XI)

5

Un procédé préféré de préparation du composé (XI) est de réaliser l'acétylation du composé de formule :



(XII)

10

à  $-40^{\circ}\text{C}$  dans le dichlorométhane comme solvant, avec de la pyridine comme base, du chlorure d'acétyle comme agent acylant, et de la 4-diméthylaminopyridine comme catalyseur.

15

On obtient le composé de formule (XI) avec un rendement très élevé, généralement supérieur ou égal à 95%, et une grande pureté puisque les dérivés furano ne sont présents qu'à l'état de traces en une proportion généralement voisine de ou inférieure à 2%.

20

On évite ainsi, selon l'invention, une purification difficile.

Dans tout ce qui suit, les utilisations thérapeutiques du composé selon l'invention peuvent mettre en oeuvre un mais aussi plusieurs composés selon l'invention.

5 L'invention concerne, en outre, le composé (I) et les composés préférés (II), et (IIa) à (IIIi) pour une utilisation comme médicament, de manière générale, le composé (I) et les composés (II) et (IIa) à (IIIi) étant nouveaux.

10 En d'autres termes, l'invention concerne l'utilisation du composé (I) et des composés (II) et (IIa) à (IIIi) de manière générale pour préparer un médicament.

Lorsqu'ils sont utilisés seuls les composés selon l'invention peuvent être utilisés pour moduler, par exemple  
15 inhiber, l'activité de l'interféron- $\gamma$  exogène ou endogène.

L'invention est donc relative aussi au composé  
.. (I) et aux composés (II) et (IIa) à (IIIi) pour une utilisation comme modulateur, par exemple inhibiteur, c'est-à-dire réducteur ou supprimeur de l'activité de  
20 l'interféron- $\gamma$  endogène ou exogène.

L'invention a trait, en outre, au composé (I) et aux composés (II) et (IIa) à (IIIi) (seul(s) : c'est-à-dire sans autre principe actif de structure différente) pour une utilisation dans le traitement de maladies liées à, ou  
25 caractérisées par la présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- $\gamma$ , il s'agit par exemple des maladies auto-immunes, inflammatoires, ou dégénératives telles que la sclérose multiple, la glomérulonéphrite, la maladie de Crohn et l'arthrite rhumatoïde, du rejet de  
30 greffes, etc...

L'invention a ainsi trait, aussi, au composé (I) et aux composés (II) et (IIa) à (IIIi) seul(s) pour une utilisation dans un traitement de complément aux traitements immunosuppresseurs utilisés, par exemple, pour  
5 éviter le rejet de greffes.

L'invention est également relative à l'utilisation de (I) (seul) et des composés (II) et (IIa) à (IIIi) pour préparer un médicament destiné au traitement des troubles, pathologies, reliés à l'activité, notamment  
10 excessive de l'interféron- $\gamma$  endogène ou exogène et à l'utilisation de (I) pour préparer un médicament destiné au traitement de maladies liées à, ou caractérisées par la présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- $\gamma$ , il s'agit par exemple des maladies auto-immunes,  
15 inflammatoires, ou dégénératives telles que la sclérose multiple, la glomérulonéphrite, la maladie de Crohn, et l'arthrite rhumatoïde, du rejet de greffes, etc...

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un composé (I) et des composés (II) et (IIa) à (IIIi) pour  
20 préparer un médicament destiné à un traitement de complément aux traitements immunosuppresseurs utilisés, par exemple, pour éviter le rejet de greffes.

L'invention a, de plus, trait à un médicament contenant un composé (ou plusieurs composés) de formule (I) ou de formule (II) ou (IIa) à (IIIi), seul(s) (c'est-à-dire  
25 sans composé actif autre) ; à une composition contenant le composé (ou plusieurs composés) de formule (I), (II), (IIa) à (IIIi), seul(s) et un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une utilisation dans le traitement de  
30 maladies liées à ou caractérisées par la présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- $\gamma$  (il s'agit par

exemple des maladies auto-immunes, inflammatoires, ou dégénératives telles que la sclérose multiple, la glomérulonéphrite, la maladie de Crohn et l'arthrite rhumatoïde, du rejet de greffes, etc... ; à une composition contenant le composé (ou plusieurs composés) de formule (I), (II), (IIa) à (IIIi) seul(s) et un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour utilisation dans un traitement de complément aux traitements immunosuppresseurs utilisés, par exemple, pour éviter le rejet de greffes.

Rappelons à ce propos que l'interféron-gamma est une cytokine proinflammatoire, dont la présence caractérise un certain nombre de pathologies liées à l'inflammation. Dans de telles situations, il est utile de supprimer ou de réduire l'activité biologique de l'interféron-gamma endogène. Chez l'animal, des modèles expérimentaux ont prouvé l'intérêt d'une telle stratégie (inhibition de l'interféron-gamma) en utilisant des anticorps monoclonaux inhibiteurs, ou une forme soluble du récepteur de la cytokine. A titre d'exemple on peut citer les maladies autoimmunes ou dégénératives (Sclérose multiple, Glomérulonéphrite, Maladie de Crohn, Arthrite rhumatoïde ...etc). De même, l'inhibition de l'interféron-gamma peut être un complément efficace aux traitements immunosuppresseurs par exemple par la ciclosporine utilisés par exemple pour éviter le rejet de greffes.

Les médicaments contenant le composé (ou des composés) (I) seul(s) peuvent être administrés à des doses qui peuvent être déterminées préalablement par des expériences de routine, en fonction notamment de l'effet recherché. Ces doses peuvent aller par exemple de 0,1 à

200 mg par individu et par jour, de préférence, de 1 à 50 mg.

L'invention concerne, en outre, un médicament contenant, outre le composé (I) ou les composés préférés (II) de (IIa) à (IIIi), de l'interféron- $\gamma$ .

Un tel médicament contient en combinaison le composé (I) et l'interféron- $\gamma$ , de préférence à raison de 0,05 à 1 mg d'interféron- $\gamma$  et de 1 à 50 équivalents du composé (I).

Dans ce médicament, le composé (I) (par exemple (II) ou (IIa) à (IIIi)) et l'interféron- $\gamma$  se présente, de préférence, sous la forme d'un complexe du composé (I) et de l'interféron- $\gamma$ . Ledit complexe permet d'augmenter la biodisponibilité de la cytokine et la protège des dégradations protéolytiques.

En d'autres termes, le composé (I) empêche la capture de l'interféron- $\gamma$  par des molécules d'héparane-sulfate endogènes, présents, par exemple, dans la matrice extracellulaire et à la surface de nombreuses cellules, et permet donc son maintien et son transport dans la circulation générale.

En outre, le composé (I) protège l'interféron- $\gamma$  contre les dégradations susceptibles de réduire ou d'annuler son activité, et il permet de maintenir l'interféron- $\gamma$  sous sa forme la plus active, jusqu'au moment de son action sur les cellules compétentes.

L'invention concerne donc :

- le complexe du composé (I) (ou (IIa) à (IIIi)) et d'interféron- $\gamma$  pour une utilisation comme médicament. En effet, ce complexe est nouveau

et son utilisation thérapeutique n'a jamais été mentionnée ;

- le complexe, ci-dessus, pour une utilisation comme immunostimulant.

5 Les effets immunostimulants comprennent, par exemple, l'effet antiprolifératif dans les cancers et l'activation des défenses immunitaires dans les maladies infectieuses, par exemple virales, bactériennes ou parasitaires, ou encore la capacité de bloquer la synthèse  
10 de collagène dans les fibroses d'organes, etc.

Et l'invention aura donc trait au complexe ci-dessus pour une utilisation dans le traitement d'une maladie choisie parmi le cancer, les maladies infectieuses, par exemple virales, bactériennes ou parasitaires, et les  
15 fibroses d'organes.

L'invention concerne, de manière générale, un médicament contenant ledit complexe, ainsi que l'utilisation du complexe pour le traitement d'une maladie, telle que mentionnée ci-dessus.

20 L'invention a trait aussi à l'utilisation du complexe, de manière générale, pour préparer un médicament et, en particulier, à l'utilisation du complexe pour préparer un médicament destiné au traitement d'une maladie, telle que mentionnée ci-dessus.

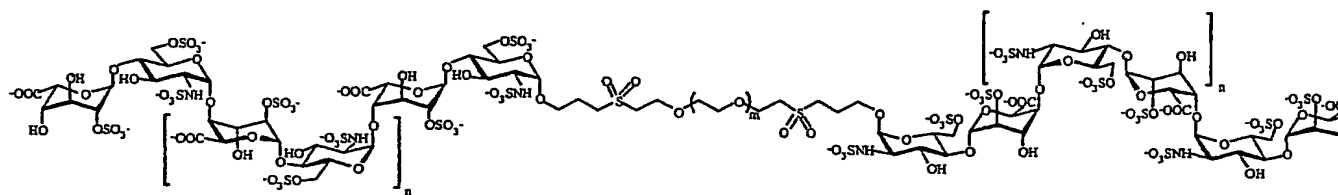
25 L'invention concerne, en outre, une composition contenant ledit complexe et un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une utilisation dans le traitement d'une maladie choisie parmi le cancer, les maladies infectieuses, par exemple virales, bactériennes ou parasitaires, et les  
30 fibroses d'organes.

L'invention va maintenant être décrite de manière détaillée dans la description qui va suivre, d'un mode de réalisation particulier de la présente invention, dans lequel le groupe espaceur est constitué essentiellement d'un polyglycol, en particulier d'un polyéthylène glycol.

Cette description est réalisée en liaison avec les dessins joints dans lesquels :

- la figure 1 représente un complexe dimère IFN $\gamma$ /HS ou molécule selon l'invention ;
- la figure 2 est un graphique qui donne le % d'inhibition I pour différentes molécules selon l'invention définies par la longueur L du bras espaceur (en Å) et du nombre de saccharides des groupements oligosaccharides (tétra, hexa ou octasaccharide).

Les composés selon l'invention peuvent être définis comme des mêmes structuraux de l'héparine ou de l'héparane sulfate ou encore comme des néoglycoconjugués répondant, en particulier, à la formule (II).



(II)

Dans ces mêmes structuraux, des tétra à octasaccharides, de type héparine, sont liés par un espaceur hydrophile de longueur modulable, par exemple un espaceur de type polyglycol.

Les molécules selon l'invention se lient spécifiquement à l'IFN $\gamma$ , à la manière de l'Héparane-Sulfate, comme cela est décrit sur la figure 1.

La mise au point d'un procédé de préparation des composés selon l'invention se heurtait essentiellement à quatre problèmes :

1. Disposer d'un couplage à haut rendement entre l'espaceur et les oligosaccharides qui demandent toujours un effort synthétique important.
2. Maîtriser la stéréochimie de la liaison entre l'espaceur et la première unité glucosamine de l'oligosaccharide. Cette stéréochimie doit être alpha, puisque c'est la stéréochimie que l'on trouve naturellement dans le polymère d'Héparane-Sulfate (HS).
3. Maîtriser la stéréochimie alpha de toutes les liaisons glycosidiques dans l'oligosaccharide.
4. Disposer d'un accès efficace à l'acide L-Iduronique, qui est un sucre rare que l'on ne peut isoler en quantité suffisante de sources naturelles pour des besoins synthétiques.

Nous décrivons dans ce qui suit la synthèse des composés selon l'invention en mettant l'accent chaque fois sur les solutions apportées par le procédé de l'invention à chacun des problèmes de synthèse énumérés ci-dessus.

1. Mise au point d'un couplage efficace à un espaceur de poly(éthylène glycol) (PEG).

Pour le couplage entre les oligosaccharides et l'espaceur, on utilise, de préférence selon l'invention, une réaction classique en chimie organique : le couplage radicalaire d'un thiol sur un alcène (19). On a testé avec succès cette méthode avec l'alpha-allyle glucosaminide 2 et les dérivés dithiol de PEG 3a-c. (schéma 1).

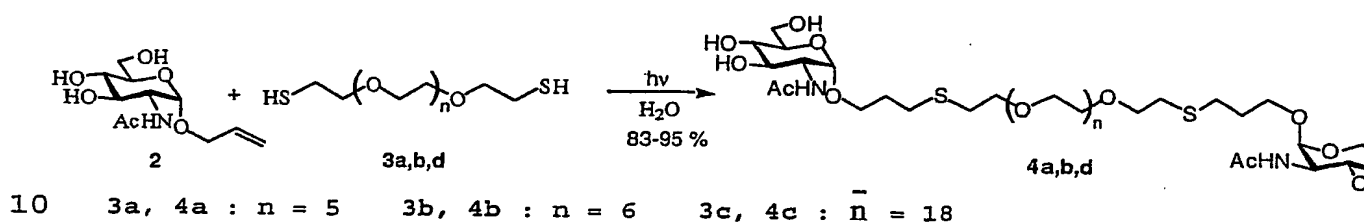


Schéma 1

## 15    2. Contrôle de la stéréosélectivité de la réaction d'alkylation anomérique.

Pour préparer le composé 2, la méthode d'alkylation anomérique, développée par R. R. SCHMIDT (20) et déjà utilisée au laboratoire (21) a été choisie. La réaction de l'alcoxyde provenant de l'hémiacétal 5a avec le bromure allyle 6 conduit exclusivement, dans le dichlorométhane, au stéréoisomère bêta.

De manière surprenante, il a été constaté que l'addition d'iodure de tétrabutylammonium inverse la stéréochimie et conduit majoritairement à l'isomère alpha dans des rapports alpha/bêta pouvant aller jusqu'à 98/2 (22) (schéma 2). Ce mode opératoire spécifique à l'invention, conduisant de manière inattendue à l'isomère alpha, n'est ni décrit, ni suggéré dans l'art antérieur.

Les conditions de réaction pour le dérivé de la glucosamine 5a ont été optimisées et appliquées telles quelles aux autres substrats. L'optimisation concerne la température, le rapport des réactifs, les concentrations, etc... Ainsi, ces conditions de réaction ont-elles été appliquées à d'autres sucres et à un autre électrophile : le bromure de benzyle 7. Il a ainsi pu être montré que cette inversion de stéréosélectivité de la réaction d'alkylation anomérique par les sels de tétrabutylammonium était générale.

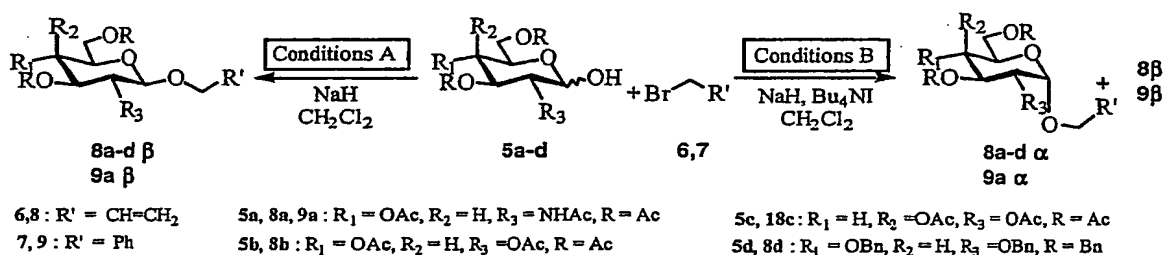


Schéma 2

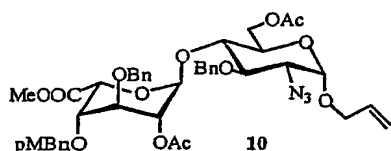
### 3. Préparation des tétra à octasaccharides, précurseurs de fragments d'héparine.

Il existe de nombreuses méthodes permettant de préparer des fragments longs d'héparine ou des mîmes (23).

Du fait de l'étape essentielle du procédé de l'invention, il est impératif de préparer des fragments possédant un groupement allyle en position anomérique, pour les couplages à l'espaceur, ce qui conduit à mettre au point un procédé spécifique. En effet, il fallait utiliser une méthode hautement convergente, basée sur la préparation d'un disaccharide convenablement protégé qui permette de

généraliser un disaccharide donneur et un disaccharide accepteur, de façon à préparer un tétrasaccharide, ce dernier pouvant lui-même servir de base pour la préparation d'hexa et octasaccharides. Les contraintes de stéréochimie des couplages oligosaccharidiques, les motifs de sulfatation désirés, ainsi que la nécessité du groupement allyle en position anomérique ont conduit à envisager le disaccharide 10 comme brique de base de la synthèse (schéma 3).

10

Schéma 3

15

### 3. 1. Synthèse du disaccharide de base 10.

#### 3. 1. 2. Nouveaux accès à l'acide L-iduronique (24).

20

L'acide L-Iduronique est un sucre rare qu'il est impossible d'isoler en quantité suffisante à partir de sources naturelles pour des besoins synthétiques. Il est donc capital de disposer de méthodes efficaces de préparation de dérivés de ce composé (25). Bien que l'addition d'organométalliques sur l'aldéhyde 12 (26) soit reportée pour se produire avec une très faible diastéréosélectivité (27), il a été entrepris, dans le cadre de l'invention, une étude de l'addition de

25

nucléophiles précurseurs de groupements carboxylates sur ce composé (schéma 4).

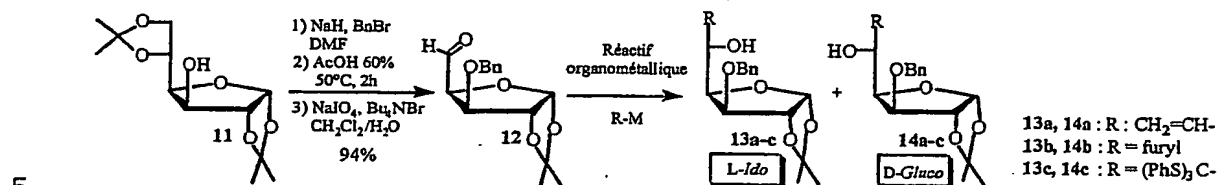


Schéma 4

10 Dans un premier temps, l'addition  
d'organométalliques vinyliques a été étudiée et il a été  
constaté, de manière étonnante, que dans certaines  
conditions, il était possible d'obtenir les  
diastéréoisomères ido et gluco 13a et 14b dans des  
15 proportions 50/50. Ce résultat est particulièrement  
intéressant dans l'optique du développement de la synthèse  
combinatoire de fragments de glycosaminoglycanes contenant  
des acides glucuroniques et iduroniques.

Il a été ensuite constaté que la proportion de  
20 stéréoisomère L-ido augmentait avec l'encombrement du  
nucléophile, pour atteindre 100 % de stéréosélectivité avec  
(PhS)<sub>3</sub>CLi. Cette addition, totalement stéréosélective du  
tris-(phénylthio)méthyllithium sur l'aldéhyde 12 est  
l'étape clef dans la préparation du dérivé pyranosique de  
25 l'acide L-iduronique 17.

Une autre amélioration remarquable du procédé du  
schéma 5 donnée sur le schéma 5bis est l'acétylation des  
cristaux du composé 15 en procédant à -40°C dans le  
dichlorométhane comme solvant, avec de la pyridine comme

base, du chlorure d'acétyle comme agent acylant et de la 4-diméthylaminopyridine comme catalyseur. Dans ces conditions, le mélange 17 ( $\alpha:\beta$  2/98) est obtenu avec 98% de rendement et les dérivés furano 16 ne sont présents qu'à l'état de traces (2%). Cette amélioration est spectaculaire car dans les conditions décrites précédemment (25) les dérivés 16 étaient obtenus avec 40% de rendement ce qui nécessitait une purification difficile et leur recyclage par désacétylation.

Le rendement global de la préparation de ce synthon, couramment employé pour la préparation de fragments d'héparine, à partir du diacéone glucose 11 est de 65 %, ce qui est bien plus élevé que les méthodes précédemment décrites qui conduisent à des rendements globaux de 25 à 30 % (schéma 5).

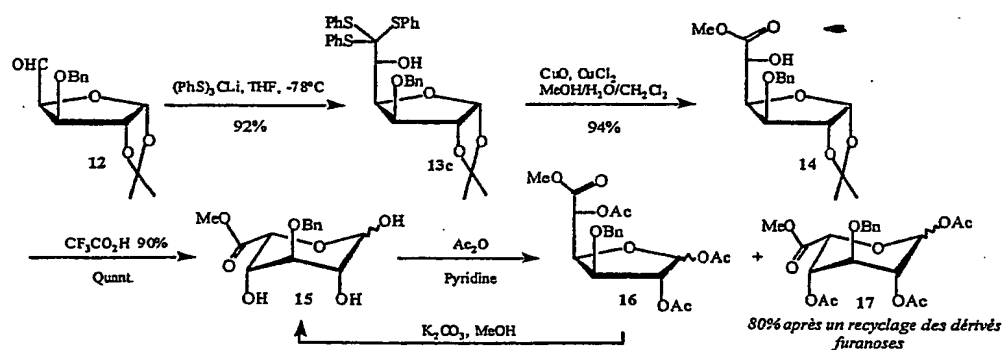
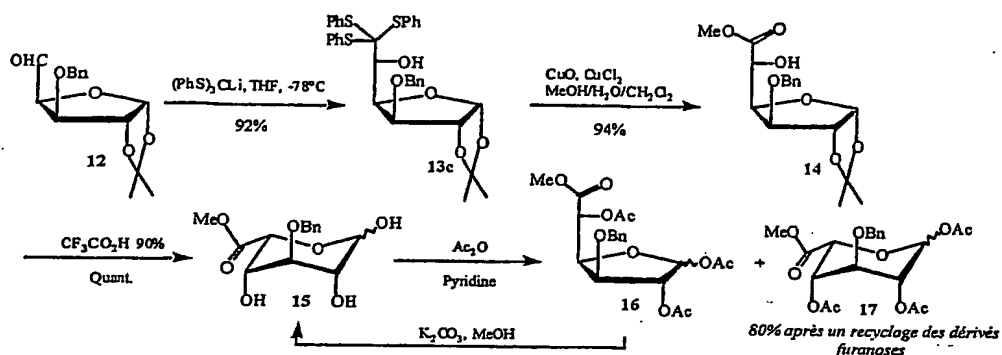


Schéma 5



### Schéma 5bis

3. 1. 3. Accès au disaccharide 10.

Ayant mis au point divers accès à des synthon d'acide L-iduroniques, il est ensuite nécessaire de préparer un dérivé de 2-azido glucose permettant la préparation de la brique de base 10. Dans les synthèses classiques impliquant un groupement azido en position 2, on introduit ce groupement en premier, puis le groupement protecteur de la position anomérique via une réaction de glycosylation. Comme nous avons déjà un accès très performant à l'alpha allyle-N-acétyle glucosaminide 8a alpha (voir schéma 4), nous avons décidé d'utiliser le triflylazide développé par VASELLA (28) pour introduire le groupement azido sur le composé 18 dont la position anomère est déjà protégée par un groupement allyle (schéma 6).

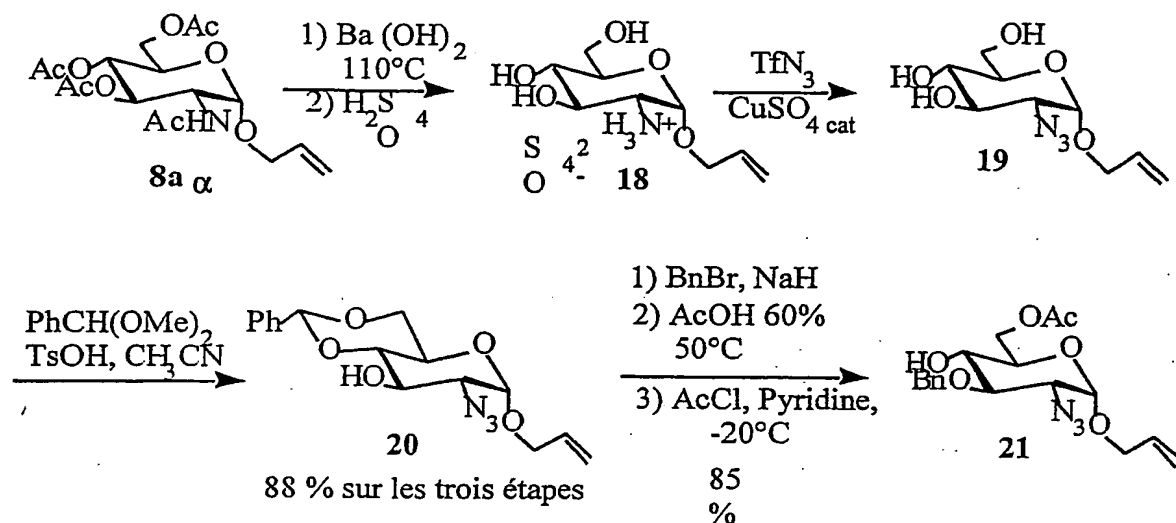


Schéma 6

5            Afin de démontrer qu'il est possible d'utiliser  
le synthon 13a pour préparer des oligosaccharides de type  
héparine, une méthodologie spécifique a été développée pour  
le transformer en donneur 26, dans lequel tous les  
groupements protecteurs du disaccharide de base 10 sont  
10 introduits avant la réaction de couplage (schéma 7).

Cette méthodologie a aussi été appliquée en  
partie au synthon glucuronique 14a, et a permis de préparer  
un donneur d'acide glucuronique possédant des groupements  
protecteurs voisins de 26.

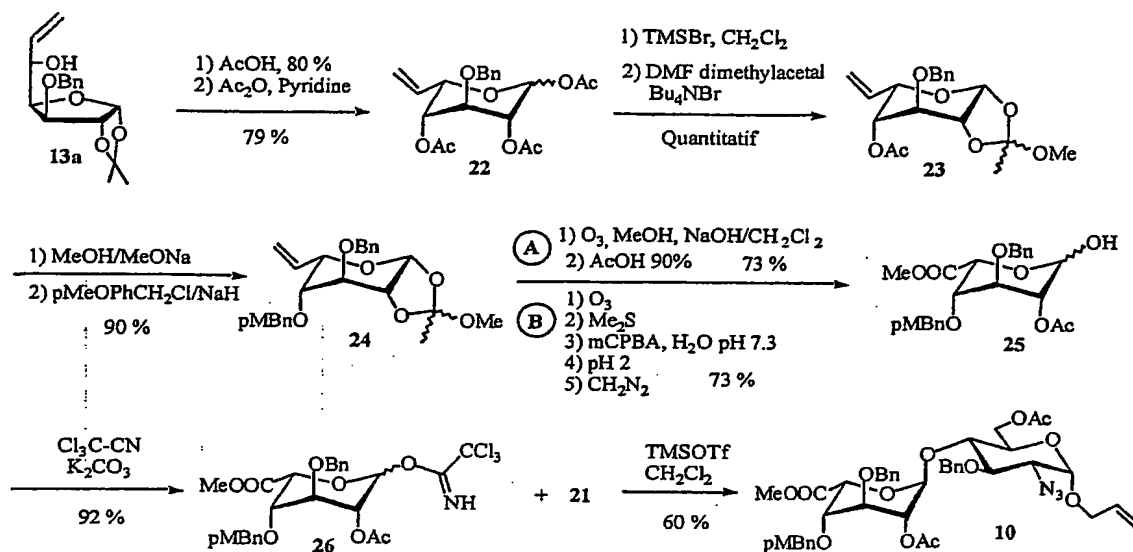


Schéma 7

5

Lorsque l'on désire préparer des GAGs : glycosaminoglycanes ne possédant que de l'acide L-iduronique, l'accès stéréosélectif au thiorthoester 13c -- est beaucoup plus rentable que l'addition non stéréosélective conduisant à 13a et 14a. Il a été montré que le synthon 17 pouvait être transformé en une étape en donneur 27. Ce composé se couple avec de bons rendements à l'accepteur 21 pour conduire au disaccharide 22, dans lequel il reste à installer les groupements protecteurs sur la partie acide iduronique, ce qui s'opère en quelques étapes (schéma 8).

10

15

33

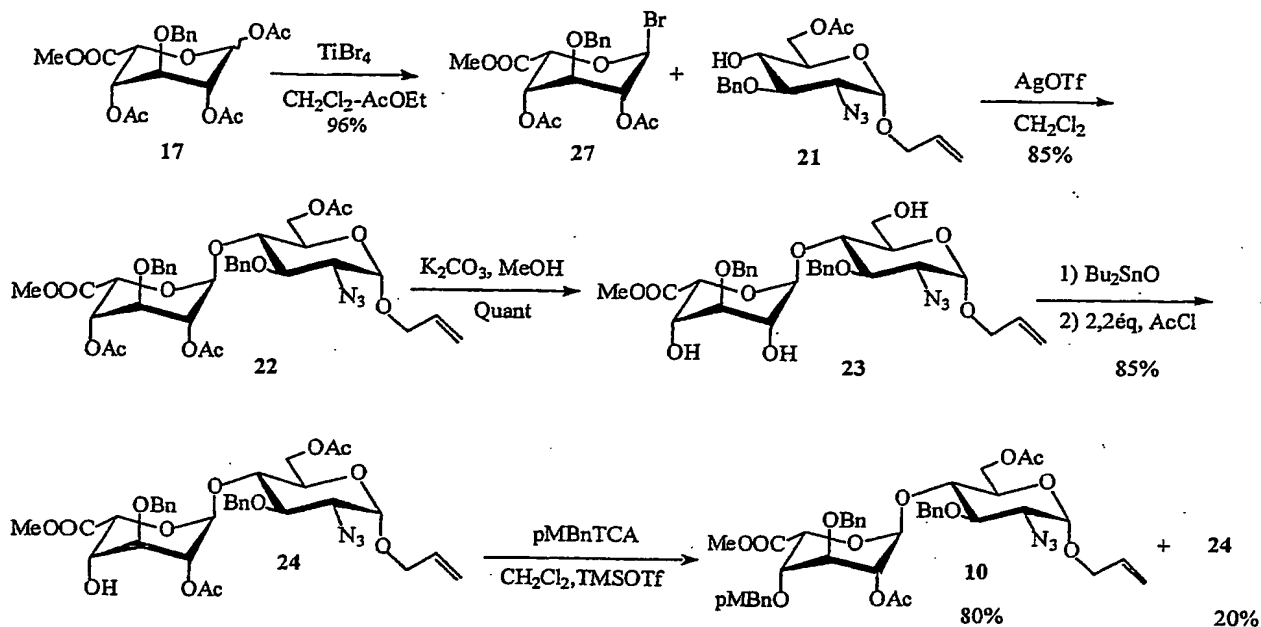


Schéma 8

### 3. 2. Stratégie efficace pour l'obtention des oligosaccharides.

A partir du disaccharide 10, on prépare aisément le disaccharide accepteur 25 par clivage oxydatif du groupement paraméthoxybenzyle par DDQ : dichlorodicyanoquinone.

Le disaccharide donneur 26 (29) est, quant à lui, préparé par isomérisation de l'allyle en 1-propényle par un catalyseur à base d'iridium, (30), puis hydrolyse de l'éther d'énol, ainsi formé, catalysé par des sels de mercure, ce qui permet la libération de la position anomérique, qui est ensuite activée sous forme de trichloroacétimide (schéma 9).

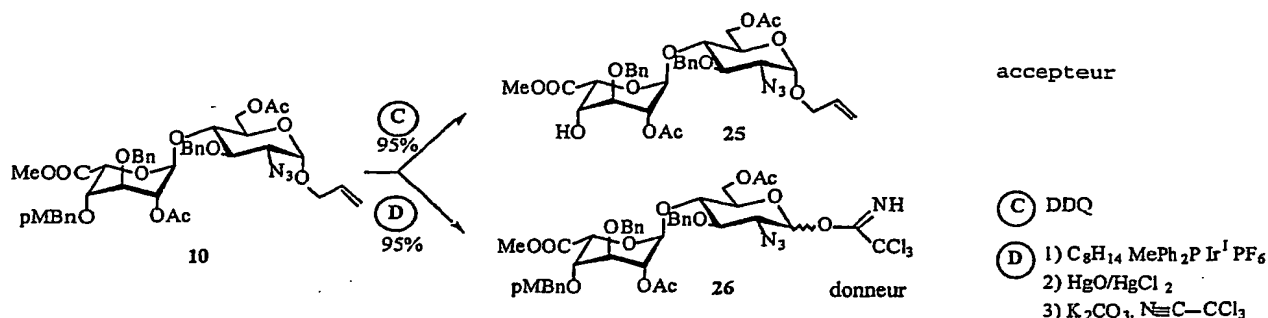


Schéma 9

Le couplage du disaccharide accepteur 25 et du disaccharide donneur 26 à  $-40^\circ C$ , en présence de TBDMSOTf, conduit avec un excellent rendement au tétrasaccharide 27, avec une totale stéréosélectivité alpha. En appliquant au tétrasaccharide 27 les mêmes opérations qu'au disaccharide, on peut préparer, avec de très bons rendements, le tétrasaccharide accepteur 28 et le tétrasaccharide donneur 29 (schéma 10) qui permettent d'obtenir les hexa et octasaccharides 30 et 31. Cette méthodologie s'étend sans problème à la préparation d'un hexadécasaccharide ou d'un dodécasaccharide.

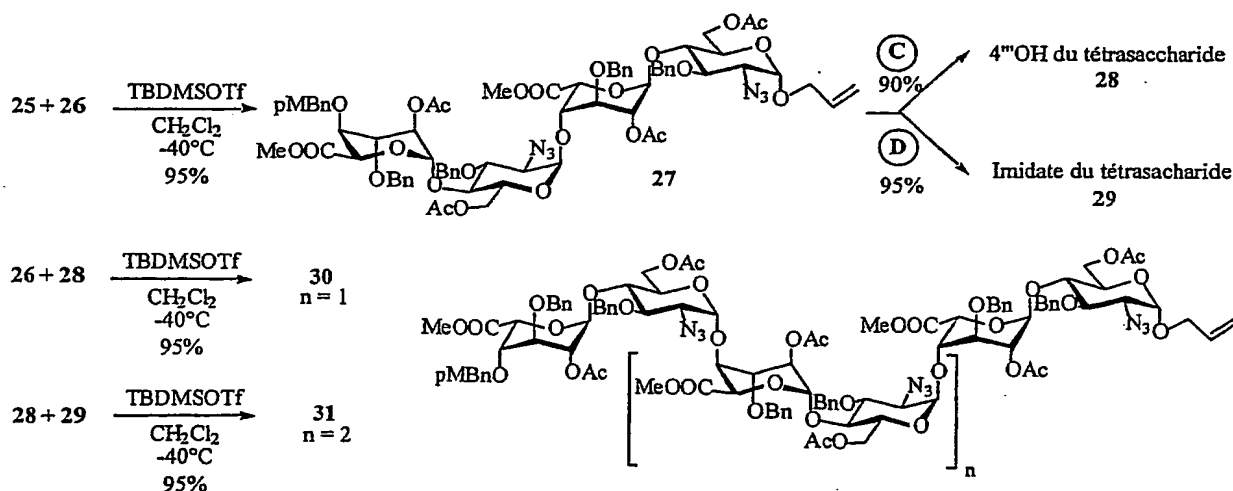


Schéma 10

#### 4. Préparation des néoconjugués.

Les oligosaccharides protégés sont transformés en composés partiellement déprotégés et solubles dans l'eau par : désacétylation, réduction de la fonction azido, sulfatation, puis saponification (schéma 11).

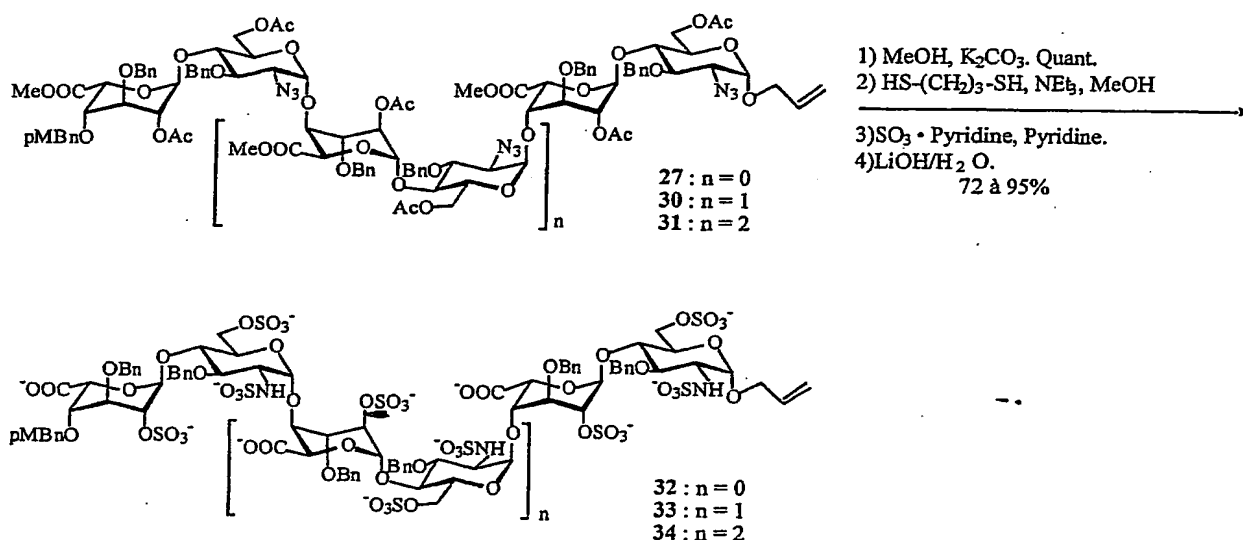
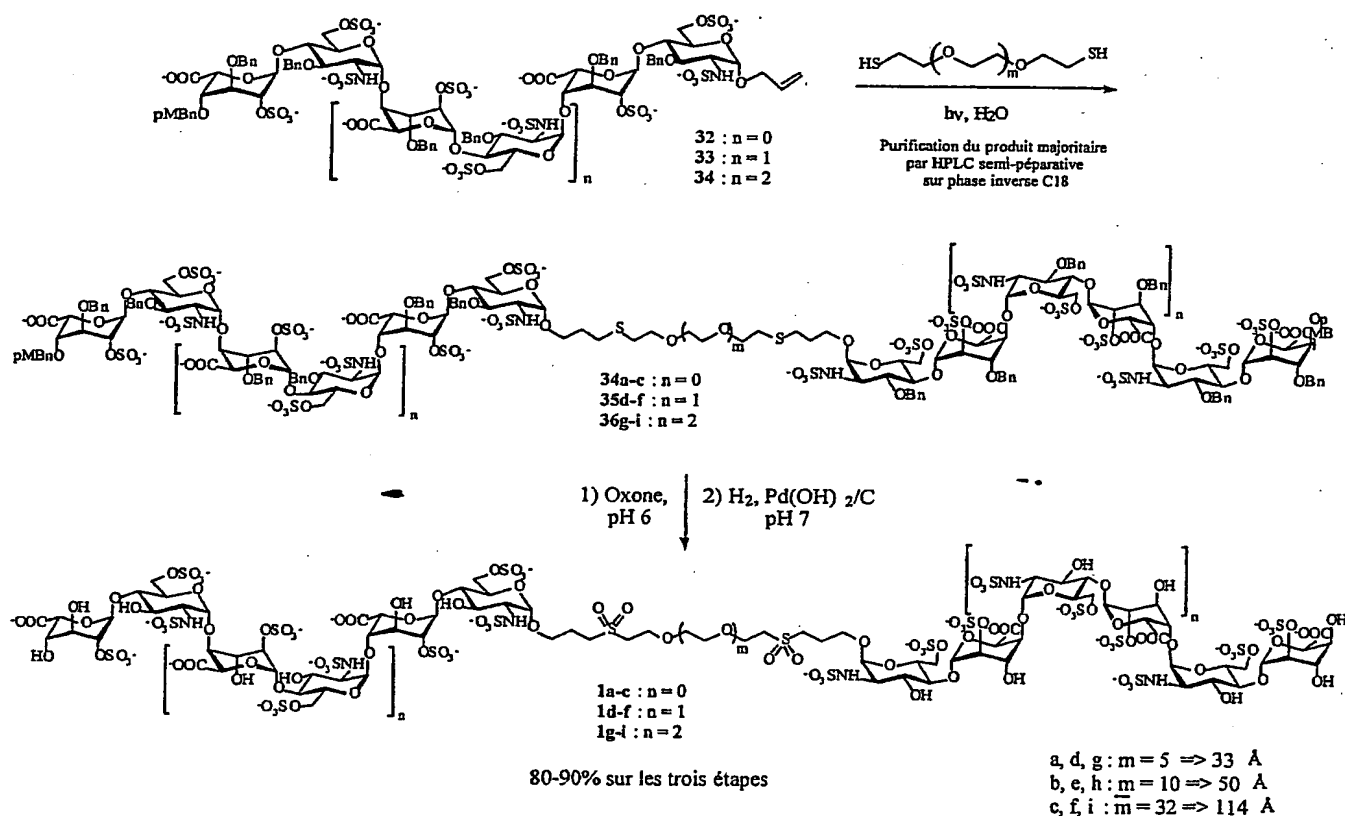


Schéma 11

On obtient ainsi les composés 32-34, solubles dans l'eau et prêts pour le couplage aux bisthioPEGs. Sous irradiation UV d'une lampe moyenne pression, le produit attendu se forme, mais accompagné de produits secondaires, issus vraisemblablement d'une oxydation des groupements benzyles que l'on élimine par chromatographie en phase inverse C18. La déprotection finale des néoglycoconjugués

est réalisée par hydrogénolyse, sur hydroxyde de palladium sur charbon en présence de tampon phosphate pH 7, après oxydation des thioéthers en sulfone pour éviter l'empoisonnement du catalyseur (schéma 12).

5



10

### Schéma 12

Les produits ainsi synthétisés ont été testés pour leur capacité à se lier à l'IFN $\gamma$ .

15

L'utilisation d'un système d'analyse d'interaction moléculaire, en temps réel (BIAcore) offre la

possibilité d'identifier et de quantifier très rapidement les affinités existant entre différentes molécules.

Cet appareil utilise un système de détection optique, le phénomène de résonance plasmonique de surface, pour mesurer la concentration de molécules ayant réagi à la surface d'un biocapteur ("sensor chip"). On immobilise de l'héparine biotinilée sur une "sensor chip" préalablement activée à la streptavidine. Il est alors possible de mesurer l'interaction d'IFN $\gamma$ , injecté en flux continu à la surface de ce capteur, avec l'héparine immobilisée. L'interaction entre l'héparine et l'IFN $\gamma$  entraîne une modification de masse à la surface du capteur, qui est enregistrée en fonction du temps. Dans une deuxième étape, l'IFN $\gamma$  est préalablement incubé avec les différents produits synthétisés, puis les complexes sont injectés à la surface du biocapteur. On mesure alors la capacité des produits testés à inhiber l'interaction l'IFN $\gamma$ /héparine.

Les résultats sont exposés sur la figure 2, et indiquent qu'une molécule contenant un bras espaceur de 5 nm (50 Å), reliant deux octasaccharides, possède une très forte affinité pour la cytokine.

Il en est de même pour les molécules contenant un bras espaceur de 33 Å et de 114 Å qui ont aussi la capacité d'interagir avec l'IFN $\gamma$ , mais avec des affinités, cependant moindres.

L'invention va maintenant être décrite en référence à l'exemple suivant, donné à titre illustratif et non limitatif.

Exemple 1

Dans cet exemple, on décrit la synthèse de composés selon l'invention : à savoir, de néoglycoconjugués fixant l'interféron, dans lesquels le groupe ou bras espaceur est issu de poly(éthylène glycol)s de longueurs variables et les deux oligosaccharides d'extrémités sont constitués par des disaccharides trisulfatés. Le produit de départ de la synthèse est le composé 8 $\alpha$ , préparé selon

5

10 LUBINEAU A. ; ESCHER S. ; ALAIS J. ; BONNAFFE D., Tetrahedron Lett. 1997, 38, 4 087 - 4 090, c'est-à-dire selon le mode opératoire 1 suivant :

**Mode opératoire 1 :**

Le chlorydrate de glucosamine commercial est peracétylé dans un mélange d'anhydride acétique (20 équivalents) et de pyridine (30 équivalents). Après évaporation des réactifs et coévaporation par du toluène, le mélange est cristallisé dans un mélange acétate d'éthyle-éther de pétrole pour conduire à la glucosamine

15

20 peracétylée avec un rendement de 90%. Les cristaux récupérés sont traités par 1,1 équivalent d'acétate d'hydrazine dans le THF anhydre (concentration 0,3 M) pendant 20h à 20°C. Le THF est alors évaporé à température ambiante sous pression réduite, le résidu coévaporé par du

25

30 toluène et l'huile résiduelle directement chromatographiée sur gel de silice par un mélange AcOEt/Ether de pétrole/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8/1/1 à 8/0/2). Le composé libre en position anomérique est obtenu avec 75% de rendement. Il est ensuite solubilisé dans le volume nécessaire de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pour avoir une concentration de 0,5 M et ajouté goutte-à-goutte à un mélange de bromure de tétrabutylammonium (2 eq.), de NaH

(1,5 eq) et de bromure d'allyle (20 eq.) refroidit à -20°C. On laisse alors remonter la température à 20°C sur 12h et l'on arrête la réaction par addition de 0,5 équivalent d'acide acétique. Le milieu réactionnel est évaporé sous  
5 pression réduite et le résidu directement chromatographié sur silice (éluant : toluène/acétone 1/0 à 7/3) pour conduire au composé 8a  $\alpha$  avec un rendement de 88%.

Le composé 8a  $\alpha$  est traité par huit équivalents de Ba(OH)<sub>2</sub> dans l'eau à 100°C pendant une nuit, le pH est  
10 alors abaissé à 3 par addition d'acide sulfurique, le mélange centrifugé pour précipiter le sulfate de baryum, le surnageant collecté, puis évaporé sous pression réduite et coévaporé à l'eau pour éliminer l'acide acétique formé. Le sel 18 est neutralisé par du carbonate de potassium et  
15 directement traité par TfN<sub>3</sub>, en suivant le protocole décrit dans ALPER P. B. ; HUNG S. C. ; WONG C. H., Tetrahedron Lett. 1996, 37, 6 029-6032, c'est-à-dire selon le mode opératoire 2 suivant :

**Mode opératoire 2 :**

20 On dissout 15 équivalents de NaN<sub>3</sub> dans le minimum d'eau nécessaire et l'on refroidit à 0°C puis on ajoute un volume équivalent de dichlorométhane et 2 équivalents d'anhydride triflique goutte à goutte. Après 2h sous agitation vive à 0°C, on laisse décanter puis on récupère  
25 la phase organique que l'on lave par un volume équivalent de solution de bicarbonate de sodium saturé. La phase organique est alors directement ajoutée sur une solution aqueuse du sel 18 et de 0,01 équivalent de sulfate de cuivre. On ajoute alors le minimum de méthanol nécessaire  
30 pour obtenir un mélange homogène. Après 4h de réaction à

20°C, on ajoute un équivalent de butylamine pour détruire le triflylazide en excès.

La solution résultante est déposée sur gel de silice 70-200  $\mu$  par évaporation et le composé 19 élué par un mélange MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 8/2.

Après évaporation sous pression réduite, le résidu est solubilisé dans de l'acétonitrile anhydre et traité par le diméthylacétal du benzaldéhyde en présence d'acide camphorsulfonique. Après deux heures à température ambiante, la solution est neutralisée par addition d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium et le composé 20 extrait par de l'éther diéthylique. Après purification par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/AcOEt), le composé 20 est traité par le bromure de benzyle en présence de NaH dans le DMF. Après dilution à l'éther diéthylique, lavage de la phase organique par de l'eau et évaporation, le résidu est traité à 50°C, par une solution d'acide acétique à 60 %, pendant deux heures. Après évaporation et coévaporation avec du toluène, le résidu est chromatographié sur gel de silice (éther de pétrole/AcOEt). Le diol ainsi obtenu est solubilisé dans de la pyridine anhydre et un équivalent de chlorure d'acétyle est ajouté à -20°C, on laisse alors la température remonter à 0°C. La réaction est terminée en une nuit. On évapore alors la pyridine sous pression réduite, le résidu est solubilisé dans l'éther diéthylique, puis on lave la phase organique obtenue par une solution diluée d'HCl, de l'eau et une solution de bicarbonate de sodium. La phase organique est alors séchée, évaporée et chromatographiée sur gel de silice avec un mélange d'éther de pétrole et d'AcOEt. On obtient

ainsi le composé 21 avec un rendement global de 75 % depuis 8a  $\alpha$ .

Par ailleurs, le dérivé 17 est préparé selon LUBINEAU A. ; GAVARD O. ; ALAIS J. ; BONNAFFE D.,  
5 Tetrahedron Lett. 2000, 307 - 311, c'est-à-dire selon le mode opératoire 3 suivant :

**Mode opératoire 3 :**

Du diacétoneglucose commercial, solubilisé dans du diméthyle formamide anhydre (concentration de 0,5 M),  
10 est traité par 1,2 équivalents de bromure de benzyle et 1,3 équivalents de NaH. Après 1h à 20°C, l'excès de NaH est détruit par de l'isopropanol. Le mélange réactionnel est alors dilué par de l'éther éthylique et la phase organique lavée trois fois par de l'eau. Après évaporation, le résidu  
15 est repris par de l'acide acétique à 60% jusqu'à atteindre une concentration de 0,1 M. Après deux heures à 50°C, le mélange est évaporé puis coévaporé par du toluène sous pression réduite. Une chromatographie sur gel de silice (éluant : éther de pétrole/acétate d'éthyle 9/1 à 2/8)  
20 permet d'obtenir le diol désiré avec 98% de rendement. Ce diol est solubilisé dans le dichlorométhane (concentration de 0,25 M), puis on ajoute le même volume d'eau, 0,5 équivalent d'hydrogénosulfate de tétrabutylammonium, 0,5 équivalents de NaHCO<sub>3</sub>, puis, après avoir abaissé la  
25 température à 0°C, 2 équivalents de NaIO<sub>4</sub> par petites portions. On laisse ensuite la température remonter à l'ambiante puis on laisse sous agitation 1h. Après décantation, on récupère la phase organique que l'on évapore puis reprends par de l'éther éthylique. La phase  
30 organique est lavée trois fois par de l'eau, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée. Le résidu est

filtré sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle) et le composé 12, obtenu quantitativement, est directement utilisé, après évaporation et coévaporation au toluène, dans l'étape ultérieure. On prépare une solution de tris-phénylthiométhyle-lithium de la manière suivante : on solubilise 1,2 équivalents (par rapport à l'aldéhyde) de tris-phénylthiométhane dans la quantité de THF nécessaire pour obtenir une concentration de 0,8 M, la température est abaissée à -78°C et le mélange mis sous agitation mécanique, puis on ajoute 1,1 équivalents (par rapport à l'aldéhyde) de n-butyllithium en solution dans l'hexane. Un précipité jaune apparaît et l'on maintient l'agitation à -78°C pendant 1h30. On ajoute alors goutte-à-goutte l'aldéhyde, solubilisé dans du THF (concentration 0,6 M). On agite à -78°C pendant une heure puis on laisse remonter la température à l'ambiante sur 16h et l'on arrête la réaction par addition d'une solution saturée de chlorure d'ammonium. La solution résultante est extraite trois fois par de l'éther éthylique, la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, évaporée puis chromatographiée sur gel de silice (éluant éther de pétrole/acétate d'éthyle 9/1 à 6/4). On obtient ainsi le composé 13c avec 92% de rendement.

Le tris-phénylethioorthoester 13c obtenu précédemment est solubilisé dans le volume de méthanol nécessaire pour obtenir une concentration de 0,05 M, on ajoute alors 1/10<sup>ème</sup> de volume d'eau et 1/10<sup>ème</sup> de volume de dichlorométhane puis 1,7 équivalents de CuO et 4 équivalents de CuCl<sub>2</sub>. Après une heure à température ambiante, le mélange est filtré sur Célite 545 et évaporé à température ambiante sous pression réduite. Le résidu est

repris dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et la phase organique est lavée par une solution saturée de NaCl, filtrée sur papier séparateur de phase et évaporée. Le mélange est purifié par chromatographie sur silice (éluant : éther de pétrole/AcOEt 8/2 à 5/5), on obtient ainsi le produit 14 avec un rendement de 94%. On traite ensuite le produit 14 par une solution d'acide trifluoroacétique à 90% pendant 30 minutes à température ambiante (concentration initiale du réactif : 0,35 M). Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis coévaporé deux fois par de l'eau. On obtient ainsi une huile qui cristallise. Ces cristaux du composé 15 sont suspendus dans du dichlorométhane (concentration 0,2 M) et la température est abaissée à  $-40^\circ\text{C}$ , on ajoute alors 9 équivalents de pyridine, 0,01 équivalent de 4-diméthylaminopyridine et 5 équivalents de chlorure d'acétyle. Après 1h d'agitation à  $-40^\circ\text{C}$ , on laisse la température remonter à l'ambinate, on dilue par du dichlorométhane et on lave la phase organique par une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ , d'eau, d'acide sulfurique 1 M et d'eau. On obtient ainsi le mélange 17 ( $\alpha/\beta$  2/98) avec un rendement de 98%.

Le dérivé 17 est converti en donneur 27 selon JACQUINET J. C. ; PETITOU M. ; DUCHAUSSOY P. ; LEDERMAN I. ; CHOAY J. ; TORRI G. ; SINAY P., Carbohydrate Res. 1984, 130, 221, c'est-à-dire selon le mode opératoire 4 suivant :

**Mode opératoire 4 :**

Le mélange 17 est mis en solution dans du dichlorométhane anhydre (concentration 0,1 M) puis on ajoute  $1/10^{\text{ème}}$  en volume d'acétate d'éthyle anhydre et on laisse réagir pendant 24h en présence de 1,3 équivalents de

TiBr<sub>4</sub>. Le mélange est dilué par du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et lavé par de l'eau glacée. La phase organique est filtrée sur papier siliconé puis concentrée. Le produit 27 ainsi obtenu est directement utilisé dans l'étape suivante.

5           Le couplage de 21 (1,2 équivalents) avec 27 s'effectue dans le dichlorométhane à 20°C, en présence de tamis 4 Å et de triflate d'argent (1,2 équivalents) et conduit, après chromatographie sur gel de silice avec le mélange éther de pétrole/AcOEt, au disaccharide 22 avec un  
10   rendement de 85 %.

          Le composé 22 est désacétylé dans le méthanol anhydre en présence de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, après neutralisation par de la résine DOWEX® 50 x 8 200 H<sup>+</sup>, filtration et évaporation, le  
15   résidu est suspendu dans du benzène, puis on ajoute 2,2 équivalents de Bu<sub>2</sub>SnO. Après 2 heures d'entraînement azéotropique de l'eau, on ajoute 3 équivalents de triéthylamine et 2.2 équivalents de chlorure d'acétyle fraîchement distillé. On obtient alors un mélange de 3  
20   produits, dont le majoritaire est le composé 24 accompagné des composés acétylés en position 6/4' et 6/2'/4'.

          Après chromatographie sur gel de silice avec le mélange éther de pétrole/AcOEt, les produits secondaires sont désacétylés et soumis de nouveau à la réaction d'acylation : on obtient ainsi après un recyclage le  
25   composé 24 avec 85 % de rendement.

          Le traitement de ce dernier par 2 équivalents de trichloroacétimide de l'alcool paraméthoxybenzylique dans le dichlorométhane en présence de 0,1 équivalent de triflate de triméthylsilyle permet d'obtenir le composé 10  
30   avec un rendement de 80 % accompagné de 20 % de 24 n'ayant pas réagi. Ces deux produits 10 et 24 sont aisément

séparables par chromatographie sur gel de silice avec le mélange éther de pétrole/AcOEt.

Le disaccharide de base 10 est transformé avec 95 % de rendement en disaccharide donneur 26 (synthétisé par une autre voie dans TABEUR C. ; MALLET J.M. ; BONO F. ; HERBERT J. M. ; PETITOU M. ; SINAY P., Bioorg., Med. Chem. 1999, 7, 2 003 - 2 012, par isomérisation de l'allyle, en présence de  $C_8H_{14}MePh_2PIr^I PF_6$  et coupure de l'énol par des sels de mercure, comme cela est décrit par OLTVOORT J. J. ; VAN BOECKEL C. A. A. ; KONING J. H. ; VAN BOOM J. H., Synthesis 1981, 305 - 308, c'est-à-dire selon le mode opératoire 5 suivant :

**Mode opératoire 5 :**

Le disaccharide 10 est solubilisé dans du THF anhydre de façon à avoir une concentration de 0,06 M. La solution est dégazée sous vide, puis on ajoute 0,013 équivalents de  $C_8H_{14}MePh_2PIr^I PF_6$ . Le mélange est redégazé puis laissé au contact de dihydrogène pendant 2 minutes et enfin redégazé puis mis sous atmosphère d'argon. Après deux heures sous agitation à température ambiante, le mélange est évaporé puis repris dans le volume d'acétone nécessaire pour obtenir une concentration de 0,05 M, on ajoute alors 1,2 équivalents d' $HgO$  et 1,1 d' $HgCl_2$ . Après deux heures sous agitation à température ambiante, le mélange est filtré sous Céelite 545, évaporé et repris par de l'éther éthylique. La phase étherée est lavée par une solution à 10% de KI, puis à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, évaporée et enfin chromatographiée sur gel de silice (éluant toluène/AcOEt 8/2 à 6/4) pour conduire au disaccharide libre en position anomérique avec un rendement de 97%.

Puis, on réalise un traitement dans le dichlorométhane par 6 équivalents de trichloroacétonitrile et 2 équivalents de  $K_2CO_3$ , suivi d'une chromatographie sur gel de silice avec le mélange éther de pétrole/AcOEt

5 1 %  $NEt_3$ . Le disaccharide 10, traité par 1,5 équivalents de DDQ dans du dichlorométhane saturé en eau conduit après lavage de la phase organique par une solution saturée de  $NaHCO_3$  et chromatographie sur gel de silice avec le mélange éther de pétrole/AcOEt au disaccharide accepteur 25 avec un  
10 rendement de 95 %.

Le couplage du disaccharide accepteur 25 et du disaccharide donneur 26 (1,3 équivalents) est effectué dans le dichlorométhane à  $-40^\circ C$  en présence de tamis 4 Å et de triflate de terbutyldiméthylsilyle (0,2 équivalents). Après  
15 addition du catalyseur, la réaction est laissée 30 minutes à  $-40^\circ C$ , puis on laisse la température remonter à  $0^\circ C$ , température à laquelle on arrête la réaction par ajout de 0,2 équivalents de triéthylamine. Une chromatographie sur gel de silice directe du mélange réactionnel avec le  
20 mélange  $CH_2Cl_2/AcOEt$ /éther de pétrole permet d'isoler le tétrasaccharide 27 avec un rendement de 95 %.

Ce dernier est alors transformé en tétrasaccharides accepteur 28 (rendement 90 %) et donneur 29 (rendement 95 %) en utilisant les mêmes séquences  
25 réactionnelles que pour le disaccharide 10. En utilisant les mêmes conditions que pour la préparation du tétrasaccharide 27, les couplages du disaccharide donneur 26 avec le tétrasaccharide accepteur 28 et du tétrasaccharide donneur 29 avec le tétrasaccharide  
30 accepteur 28 conduisent à l'hexasaccharide 30 et à l'octasaccharide 31 avec des rendements de 95 %.

Les oligosaccharides 27, 30 et 31 sont désacétylés dans le méthanol anhydre en présence de 0,5 équivalent de  $K_2CO_3$  anhydre. Après neutralisation des milieux réactionnels par de la DOWEX 50 X 8 200  $H^+$  et évaporation, les produits sont purifiés par chromatographie sur gel de silice et obtenus avec des rendements de 86 à 95 %. La réduction des groupements azido est effectuée par le propane dithiol (2 équivalents par groupement azido) dans le méthanol en présence de triéthylamine (2 équivalents par groupement azido). Après évaporation du méthanol par balayage d'argon, les résidus sont chromatographiés sur gel de silice ( $CH_2Cl_2/MeOH$ ) pour conduire aux composés aminés avec des rendements de 90 % à 80 %.

Ces composés sont ensuite sulfatés par le complexe pyridine. $SO_3$  (5 équivalents par fonction à sulfater) dans la pyridine pendant 16 heures à 20°C, suivies de 24 heures à 55°C. L'excès d'agent sulfatant est détruit par 16 équivalents de méthanol et le mélange directement chromatographié sur SEPHADEX® LH-20 ( $CH_2Cl_2/MeOH$  1/1), puis sur colonne phase inverse C18 ( $MeOH/tampon$   $AcOH-Net_3$  5 mM pH 7,0). Après échange sur résine BIORAD® AG 50 W X 8 200  $Na^+$ , les oligosaccharides sulfatés sont obtenus avec des rendements allant de 80 à 95 %. La saponification est effectuée pendant 48 heures à 37°C, en présence de lithine aqueuse (26 équivalents par ester à saponifier) et d'eau oxygénée (3 équivalents par rapport à la lithine). Le pH est alors amené à 5 par addition d'acide acétique (0,75 équivalents par rapport à la lithine) et le mélange purifié par chromatographie sur colonne phase inverse C18 ( $MeOH/tampon$   $AcOH-Net_3$  10 mM pH

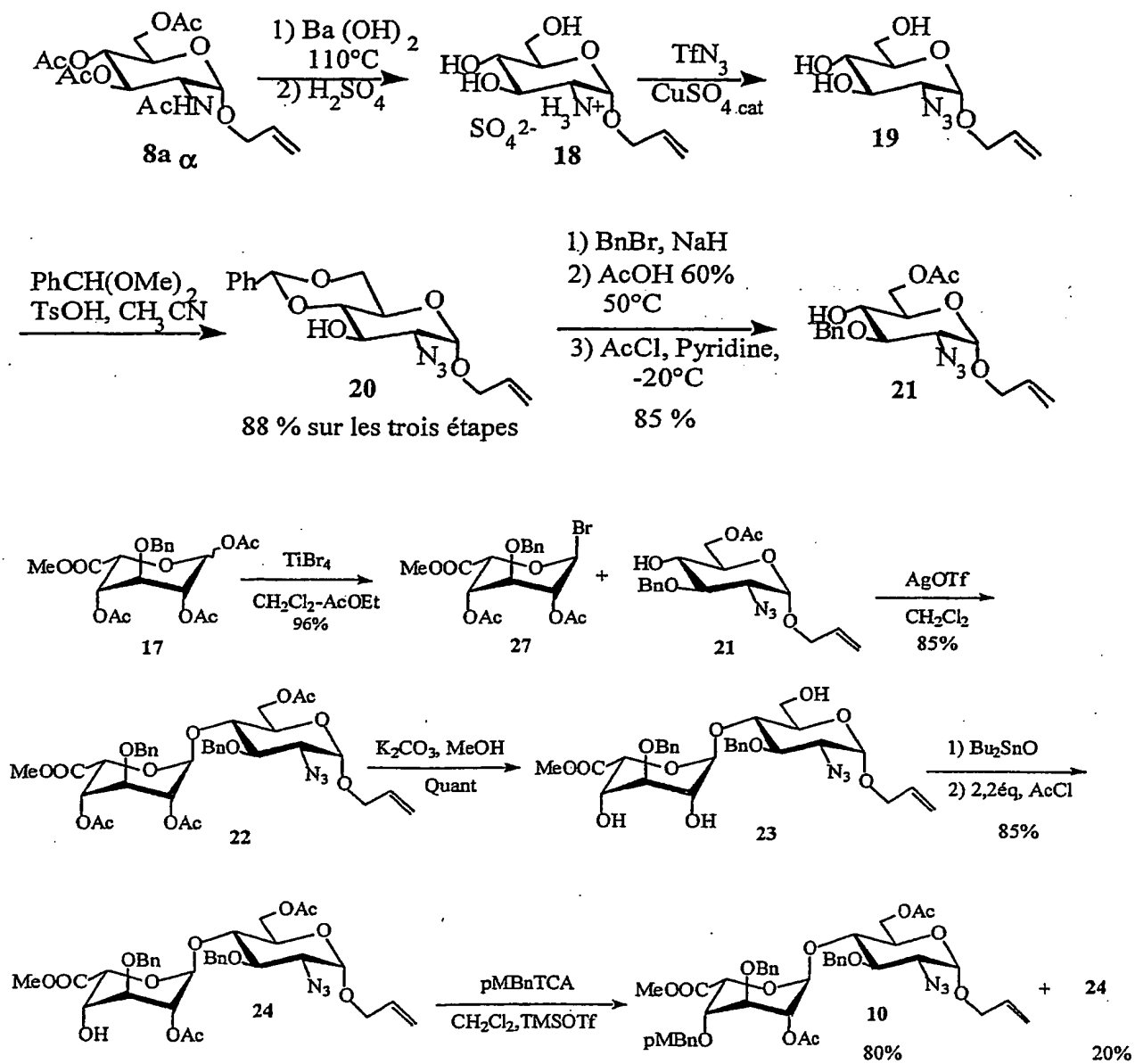
7,0). Après échange sur résine BIORAD® AG 50 W X 8 200 Na<sup>+</sup>, les oligosaccharides 32 à 34, dans lesquels respectivement  $n = 0, 1$  et  $2$ , sont obtenus avec des rendements de 90 % à quantitatifs.

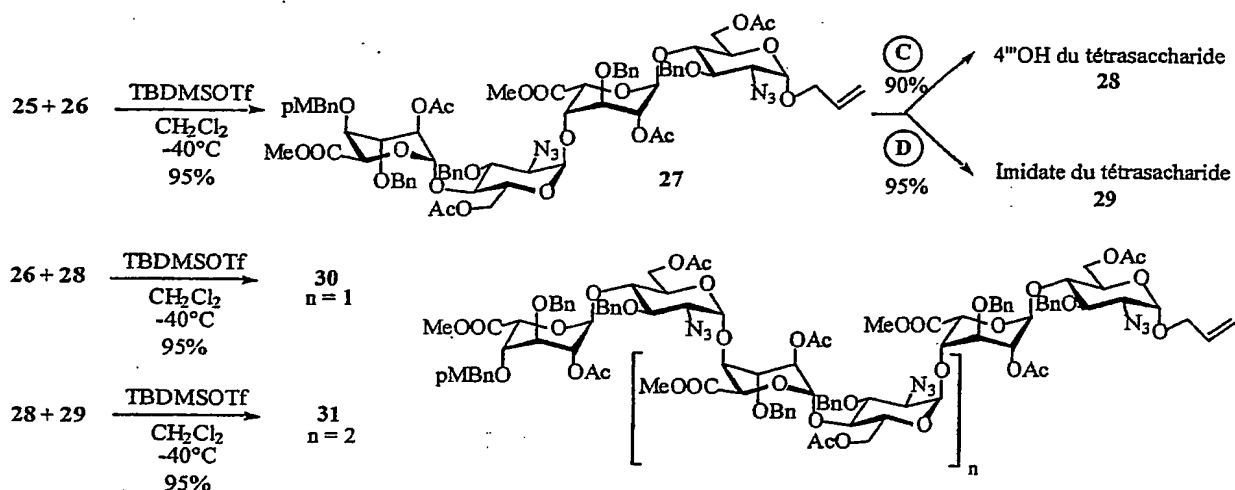
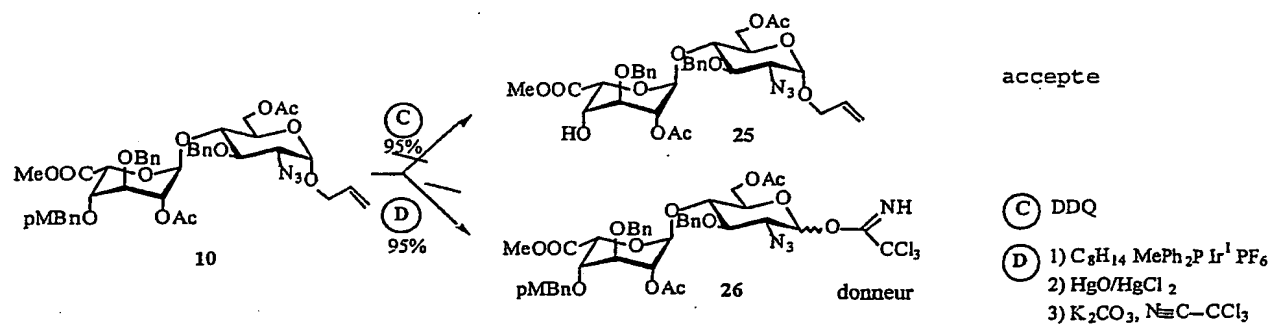
5 Les couplages des oligosaccharides 32 à 34 (2,5 équivalents) sur les espaceurs dithiols dérivés de polyéthylène glycol de longueurs variables : à savoir  $m = 5, 10$  et  $32$ , à une concentration de  $0,2$  M dans l'eau, s'effectuent sous irradiation ultraviolette à  $365$  nm ou par  
10 chauffage en présence d'un initiateur de radicaux.

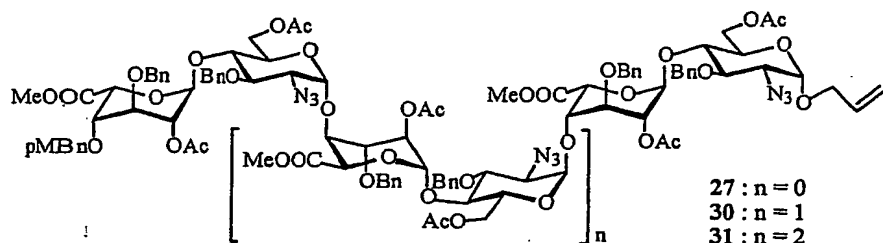
Le mélange est directement traité par  $8$  équivalents d'oxone, c'est-à-dire par une solution à  $0,2$  M, amenée à pH  $6$  par addition de  $K_2HPO_4$ . Après  $4$  heures de réaction à  $20^\circ C$ , l'excès d'oxydant est réduit par addition  
15 d'une solution de thiosulfate de sodium et le mélange est directement purifié par HPLC semi-préparative sur phase inverse C18 ( $CH_3CN$ /tampon  $AcOH-NEt_3$   $5$  mM pH  $7,0$ ). Après échange sur résine BIORAD® AG  $50$  W X  $8$   $200$  Na<sup>+</sup>, les oligosaccharides sont resolubilisés dans  $100$   $\mu L$  de tampon  
20 phosphate de sodium  $40$  mM pH  $7$  et mis sous pression atmosphérique d'hydrogène en présence d'un équivalent massique d'hydroxyde de palladium  $20$  % sur charbon. Après  $48$  heures de réaction à  $20^\circ C$ , les échantillons sont filtrés sur célite  $545$ , puis dessalés sur BIOGEL®  $10$  DG ( $H_2O$ ). On  
25 obtient ainsi les composés IIIa-i avec un rendement de  $80$  à  $90$  % sur ces trois étapes. Parallèlement, les oligosaccharides  $32$  à  $34$  ont été débenzylés quantitativement dans les mêmes conditions. Pour les composés  $1a$  à  $1c$ ,  $n = 0$ , pour les composés  $1d$  à  $1f$ ,  $n = 1$ ,  
30 et pour les composés  $1g$  à  $1i$ ,  $n = 2$ . Pour les composés  $1a$ ,  $1d$  et  $1g$  :  $m = 5$  et la longueur du bras espaceur est de

33 Å, pour les composés 1b, 1c, 1h :  $m = 10$  et la longueur du bras espaceur est de 50 Å, et pour les composés 1c, 1f et 1i :  $m = 32$  et la longueur du bras espaceur est de 114 Å.

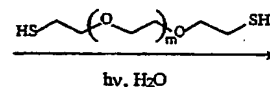
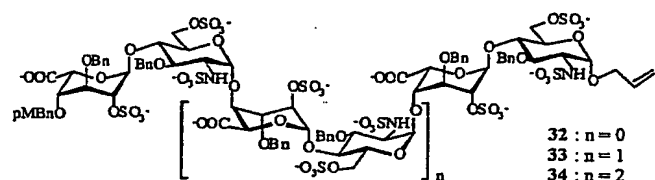
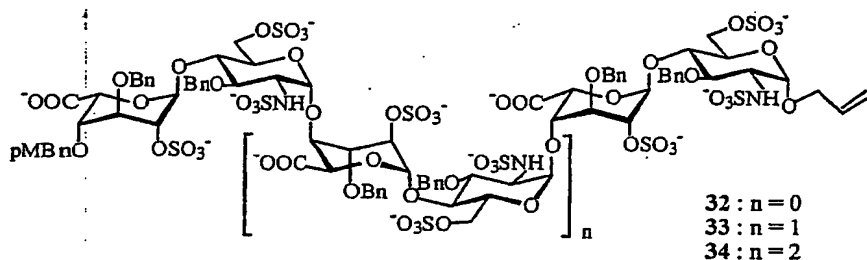
50



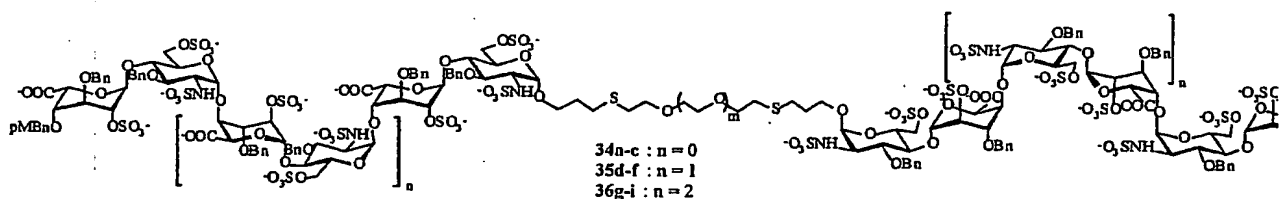




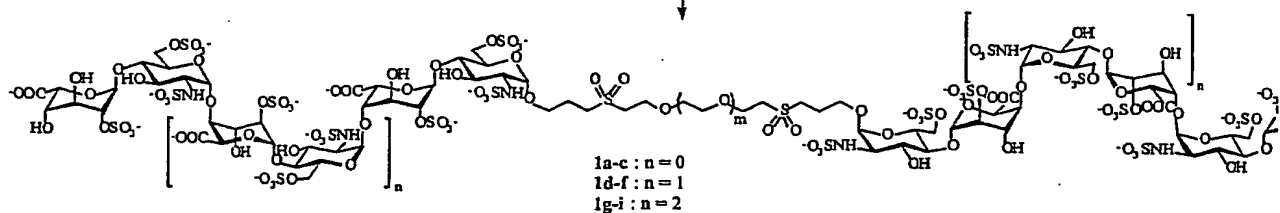
- 1) MeOH,  $K_2CO_3$ , Quant.
  - 2)  $HS-(CH_2)_3-SH$ ,  $NEt_3$ , MeOH
- 
- 3)  $SO_3 \cdot$  Pyridine, Pyridine.
  - 4) LiOH/ $H_2O$ . 72 à 95%



Purification du produit majoritaire  
par HPLC semi-préparative  
sur phase inverse C18



1) Oxone, pH 6  
2)  $H_2$ , Pd(OH) $_2$ /C, pH 7



80-90% sur les trois étapes

a, d, g :  $m = 5 \Rightarrow 33 \text{ A}$   
b, e, h :  $m = 10 \Rightarrow 50 \text{ A}$   
c, f, i :  $m = 32 \Rightarrow 114 \text{ A}$

REFERENCES

1. BILLIAU A., Adv. Immunol. 1996, 65 : 61 - 130.
2. BOUTIN C., E. NUSSBAUN, I. MONNET, J. BIGNON,  
5 R. VANDERSCHUEREN, J. C. GUERIN, O. MENARD, P. MIGNOT,  
G. DABOUIIS and J. Y. DOUILLARD, 1994, Cancer 74 :  
2 460 - 2 467, ESCUDIER B., F. FARACE, E. ANGEVIN, F.  
TRIEBEL, S. ANTOUN, B. LECLERCQ, M. BRANDELY,  
A. ABOUDARAM, G. NITENBERG and T. HERCEND., 1993, Eur.  
10 J. Cancer 29A : 724 - 728. Jett, J. R. , A. W.  
MAKSYMIIUK, J. Q. Su, J. A. MAILLIARD, J. E. KROOK, L.  
K. TSCHETTER, C. G. KARDINAL, D. I., TWITO, R. LEVITT,  
and J. B. GERSTNER. 1994. J. Clin. Oncol. 12 :  
2 321 - 2 326.
- 15 3. GALLIN J. I., 1991, New. Engl. J. Med. 324 :  
509 - 516.
4. CANNON, G. W., R. D. EMKEY, A. DENES, S. A. COHEN, P.  
A. SAWAY, F. WOLFE, A. M. JAFFER, A. L. WEAVER, B. J.  
MANASTER, and K. A. MCCARTHY, 1993. J. RHEUMATOL. 20 :  
20 1867 - 1873.
5. CZARNIECKI, C. W., and G. SONNENFELD., 1993. APMIS  
101 : 1 - 17. MURRAY, H. W., 1994. Am. J. Med.  
97 : 459 - 467.
6. KAKUMU, S., T. ISHIKAWA, M. MIZOKAMI, E. ORIDO, K.  
25 YOSHIOKA, T. WAKITA, M. YAMAMOTO., 1991., J. MED.  
Virol. 35 : 32 - 37.
7. FREUNDLICH B, JIMENEZ SA, STEEN VD, MEDSGER TA,  
SZKOLNICKI M, JAFFE HS., 1992., Arthritis Rheum.  
35 : 1134-1142.
- 30 8. TODD P. A. and GOA K. L., 1992., Grugs 43 : 111 - 122.

9. FROYEN G. and BILLIAU A., 1997, *Biotherapy* 10 : 49 - 57.
10. OZMEN L., ROMAN D., FOUNTOULAKIS M., SCHMID G., RYFFEL B., GAROTTA G. J., *Interferon Res*, 1994, 14 : 283 - 4.
- 5 OZMEN L., ROMAN D., FOUNTOULAKIS M., SCHMID G., RYFFEL B., GAROTTA G., *Eur. J. Immunol.*, 1995, 25 : 6 - 12.
11. LORTAT-JACOB H., H. K. KLEINMAN, and J. A. GRIMAUD, 1991, *J. Clin. Invest.*, 87 : 878 - 883. LORTAT-JACOB H. and J. A. GRIMAUD, 1991, *Cell. Mol. Biol.*
- 10 37 : 253 - 260. LORTAT-JACOB H. and J. A. GRIMAUD, 1991, *FEBS Lett.* 280 : 152 - 154.
12. LORTAT-JACOB H. BALTZER F. and GRIMAUD J. A., Heparin decreases the blood clearance of interferon-gamma and increases its activity by limiting the processing of
- 15 its C-terminal sequence, 1996, *J. Biol. Chem.*, 271, 16 139 - 16 143.
13. LORTAT-JACOB H., BRISSON C., GUERRET S. and MOREL G., 1996, *Cytokine* 8, 557 - 566.
14. DIANZANI F., 1992, *J. Interferon Res.*, 5 : 109 - 118.
- 20 15. HALME M., MAASILTA P., REPO H., RISTOLA M., TASKINEN E., MATTSON K., CANTELL K., 1995, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 31 : 93 - 101.
16. LACK G., BRADLEY K. L., HAMELMANN E., RENZ H., LOADER J. LEUNG D. Y., LARSEN G., GELFAND E. W., 1996, *J.*
- 25 *Immunol.* 157 : 1 432 -9.
17. SHORT S. M., PAASCH B. D., TURNER J. H., WEINER N., DAUGHERTY A. L., MRSNY R. J., 1996, *Pharm/ Res.* 13 : 1 020 - 7.
18. LORTAT-JACOB H., J. TURNBULL and J. A. GRIMAUD, 1995,
- 30 *Biochem., J.* 310 : 497 - 505.

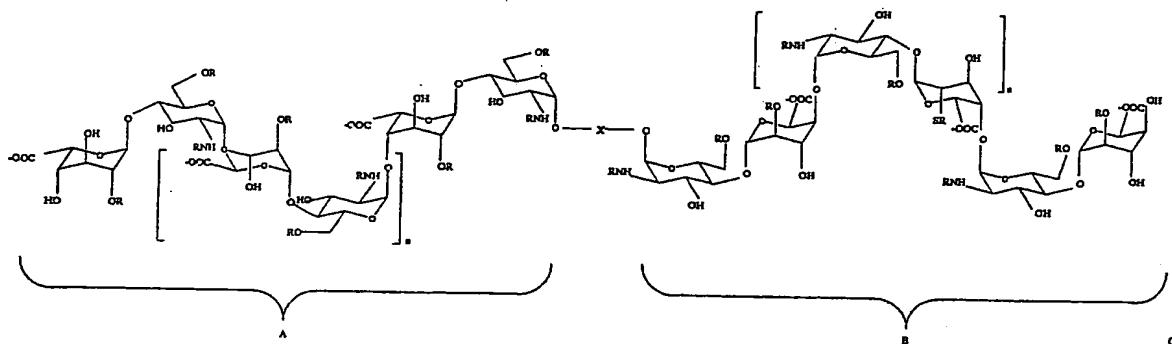
19. LEE, R. T., LEE Y. C., Carbohydrate Res., 1974, 37, 193 - 201.
20. (a) SCHMIDT R. R., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1986, 25, 212 - 235, (b) KLOTZ W., SCHMIDT R. R., Liebigs Ann. Chem., 1993, 683 - 690, (c) KLOTZ W., SCHMIDT R. R. J., Carbohydr. Chem., 1994, 13, 1 093 - 1 101, (d) TERJUNG A., JUNG K. H., SCHMIDT R. R., Carbohydr. Res., 1997, 297, 229 - 242.
21. LUBINEAU A., BIENAYME H., LE GALLIC J. J., Chem. Soc. Chem. Commun., 1989, 1 918 - 1 919.
22. LUBINEAU A., ESCHER S., ALAIS J., BONNAFFE D., Tetrahedron Lett., 1997, 38 : 4 087 - 4 090.
23. SAKAIRI N., BASTEN J. E. M., GIJSBERT A., VAN DER MAREL G. A., VANBOECKEL C. A. A., VAN BOOM, J. H., Chem. Eur. J., 1996, 2, 1 007 - 1 013. PETITOU M., DUCHAUSSOY P., BERNAT A., HOFFMANN P., HERBERT J. M., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1997, 7, 2 067 - 2 070, PETITOU M., DUCHAUSSOY p., DRIGUEZ P. A., JAURAND G., HERAULT J. P., LORMEAU J. C., VAN BOECKEL C. A. A., HERBERT, J. M. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1998, 37, 3 009 - 3 014, LEI P.-S., DUCHAUSSOY P., SIZUN P., MALLET J. M., PETITOU M., SINAY P., Bioorg. Med. Chem., 1998, 6, 1 337 - 1 346, BASTEN J. E. M., DREEF-TROMP, C. M., DE VIJS B., VAN BOECKEL C. A. A. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 1 201 - 1 206, DUCHAUSSOY P., JAURAND G., DRIGUEZ P. A., LEDERMAN I., GOURVENEC F., STRASSEL J. M., SIZUN P., PETITOU M., HERBERT J. M., Carbohydrate Res., 1999, 317, 63 - 84, DUCHAUSSOY P., JAURAND G., DRIGUEZ P. A., LEDERRMAN I. CECCATO M. L., GOURVENEC F., STRASSEL J. M., SIZUN P., PETITOU M., HERBERT J. M., Carbohydrate Res., 1999,

- 317, 84-99, KOSHIDA S., SUDA Y., SOBEL M., ORMSBY J., KUSUMOTO, Bior. Med. Chem. Lett., 1999, 9, 3 127 - 3 132, KOVENSKY J. DUCHAUSSOY P., BONO F., SALMIVIRTA M., SIZUN P., HERBERT J. M., PETITOU M.,  
5 SINAY P., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, 9, 1567 - 1580, LA FERLA B., LAY L., GUERRINI M., POLETTI M., PANZA L., RUSSO, Tetrahedron 1999, 55, 9867 - 9880.
24. LUBINEAU A., GAVARD O., ALAIS J., BONNAFFE D.,  
10 Tetrahedron Lett., 2000, 307 - 311.
25. (a) MACHER I., DAX K., WANEK E., WEIDMANN H., Carbohydrate Res., 1980, 80, 45-51, (b) JACQUINET J. C., PETITOU M., DUCHOSSOY P., LEDERMAN I., CHOAY J., TORRI G., SINAY P., Carbohydrate Res., 1984, 130,  
15 183 - 193, (c) BAGGETT N., SAMRA A. K., Carbohydrate Res., 1984, 127, 149 - 153, (d) MEDAKOVIC D., Carbohydrate Res., 1994, 253, 299 - 300, (e) DROMOWICZ M., KOLL P., Carbohydrate Res., 1998, 308, 169 - 171, (f) HINOUE H., KUROSAWA H., MATSUOKA K., TERUNUMA D.,  
20 KUZUHARA H., Tetrahedron Lett., 1999, 40, 1511 - 1504. Et références citées (g) ADINOLFI M., BARONE G., DE LORENZO F., IADONISI A., SYNLETT, 1999, 336 - 338, (h) OJEB A R., DE PAZ, j. L., MARTIN-LOMAS M., LASSALETTA J. M., SYNLETT, 1999, 1316 - 1318. TAKAHASHI H.,  
25 HITOMI Y., IWAI Y., IKEGAMI, S. J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 2 995 - 3 000.
26. HORTON D., SWANSON F. O., Carbohydrate Res., 1970, 14, 159 - 171, HORTON D., TSAI J. H., Carbohydrate Res., 1977, 58, 89 -108.

27. DANISHEFSKY S. J., DENINNO M. P., PHILIPS G. B., ZELLE R. E., LARTEY P. A., Tetrahedron, 1986, 42, 2 809 - 2 819.
28. (a) VASELLA A., WITZIG C. Chiara J. L., MARTIN-LOMAS M., Helvetica Chim. Acta 1991, 74, 2 073 - 2 077, (b) 5 ALPER P. B., HUNG S. C., WONG C. H., Tetrahedron Lett. 1996, 37, 6 029 - 6 032.
29. TABEUR C., MALLET J. M., BONO F., HERBERT J. M., PETITOU M., SINAY P., Bioorg. Med. Chem., 1999, 7, 10 2 003 - 2 012.
30. OLTVOORT J. J., VAN BOECKEL C. A. A., KONING J. H., VAN BOOM J. H., Synthesis, 1981, 305 - 308.

REVENDICATIONS

1. Composé susceptible de se lier à l'interféron-gamma (IFN $\gamma$ ) choisi parmi les molécules  
5 répondant à la formule (I) suivante :



dans laquelle X est un groupe espaceur divalent d'une  
10 longueur suffisante pour permettre aux deux fragments oligosaccharides A et B de se lier chacun à l'une des séquences peptidiques 125 à 143 des extrémités C-terminales d'un homodimère d'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et n représente un  
nombre entier de 0 à 10, par exemple égal à 0, 1, 2, 3, 4 ou  
15 5 et chaque R représente indépendamment un atome d'hydrogène un groupe  $\text{SO}_3^-$ , ou phosphate, à la condition qu'aucun groupe  $\text{SO}_3^-$  ne se trouve en position 3 des unités glucosamines du composé (I).

2. Composé selon la revendication 1, dans lequel  
20 tous les R représentent un groupe  $\text{SO}_3^-$  ou tous les groupes R représentent un groupe phosphate.

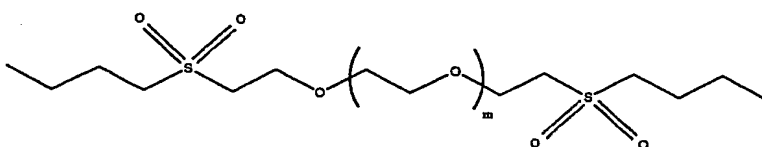
3. Composé selon la revendication 1, dans lequel le groupe espaceur est de longueur de 15 à 150 Å, de préférence de 33 à 50 Å.

4. Composé selon la revendication 1, dans lequel le groupe espaceur est constitué par une chaîne carbonée, de préférence de 1 à 120C, dont un ou plusieurs des atomes de carbone sont éventuellement remplacés par un hétéroatome choisi parmi N, S, P et O, un groupe SO<sub>2</sub>, un groupe aryle, ladite chaîne carbonée portant, en outre, éventuellement un ou plusieurs groupes anioniques.

5. Composé selon la revendication 4, dans lequel lesdits groupes anioniques sont choisis parmi les groupes sulfate, phosphate et les groupes carboxyliques.

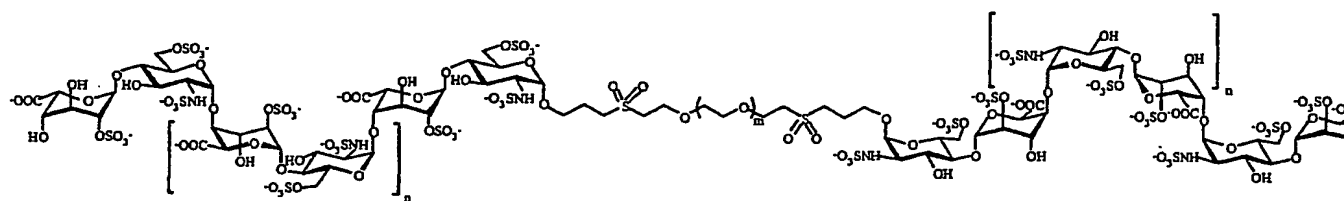
6. Composé selon la revendication 4, dans lequel le groupe espaceur est issu d'un polyglycol choisi, de préférence, parmi les poly(alkylène glycol) dont le groupe alkylène comprend de 1 à 4 C, tel que le poly(éthylène glycol).

7. Composé selon la revendication 6, dans lequel le groupe espaceur répond à la formule :



dans laquelle  $m$  est un nombre entier de 5 à 32.

8. Composé selon la revendication 7, répondant à la formule (II) suivante :



(II)

5 dans laquelle n représente un nombre entier de 0 à 10, par exemple égal à 0, 1, 2, 3, 4 ou 5, et m est un nombre entier de 5 à 32.

9. Composé (IIa) répondant à la formule (II) selon la revendication 8, dans laquelle n = 0 et m = 5.

10 10. Composé (IIb) répondant à la formule (II) selon la revendication 8, dans laquelle n = 0 et m = 10.

11. Composé (IIc) répondant à la formule (II), selon la revendication 8, dans laquelle n = 0 et m = 32.

12. Composé (IId) répondant à la formule (II), selon la revendication 8, dans laquelle n = 1 et m = 5.

15 13. Composé répondant à la formule (II), selon la revendication 8, dans laquelle n = 1 et m = 10.

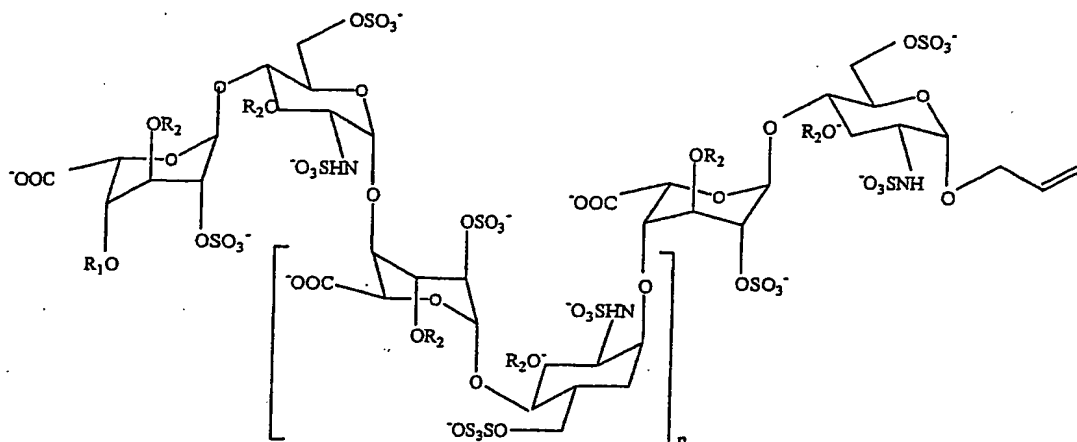
14. Composé (IIe) répondant à la formule (II), selon la revendication 8, dans laquelle m = 1 et m = 32.

20 15. Composé (IIg) répondant à la formule (II), selon la revendication 8, dans laquelle n = 2 et m = 5.

16. Composé (IIh) répondant à la formule (II), selon la revendication 8, dans laquelle n = 2 et m = 10.

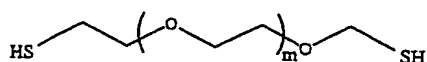
17. Composé (IIi) répondant à la formule (II), selon la revendication 8, dans laquelle n = 2 et m = 32.

25 18. Procédé de préparation d'un composé susceptible de se lier à l'interféron-gamma (IFN $\gamma$ ) de formule (II) selon la revendication 8, dans lequel on réalise le couplage radicalaire de deux composés solubles dans l'eau, précurseurs d'oligosaccharides de formule  
30 (III) :



(III)

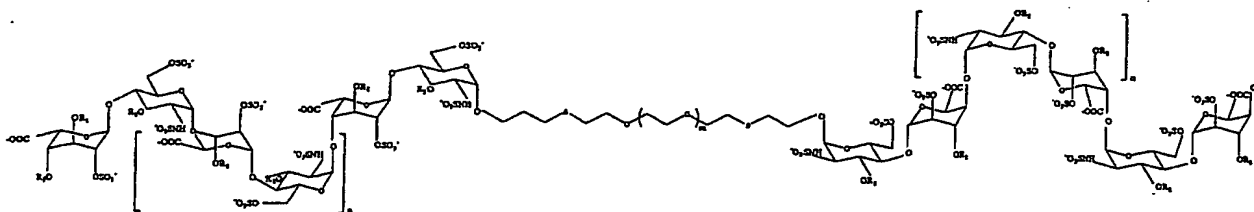
dans laquelle  $n$  est un nombre entier de 0 à 10, par exemple égal à 0, 1, 2, 3, 4 ou 5, et  $R_1$  et  $R_2$  représentent un groupe protecteur du groupe hydroxyle choisi, de préférence, parmi les groupes p-méthoxybenzyle et benzyle, avec un composé dithiol précurseur du groupe espaceur de formule :



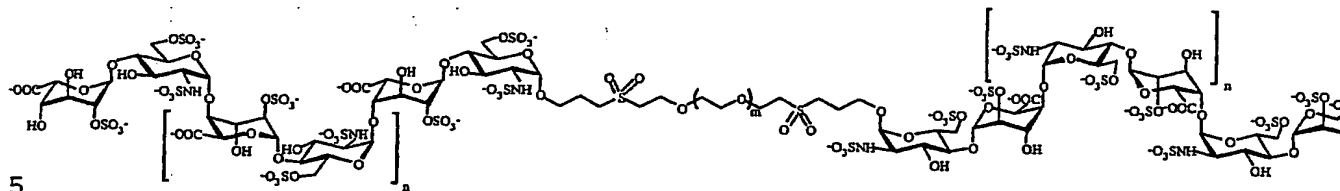
10

dans laquelle  $m$  est un nombre entier de 5 à 32, pour obtenir un composé de formule (IV) :

15



puis, on oxyde les fonctions thioéthers en sulfones et on réalise la déprotection finale du composé (IV) pour donner le composé final de formule (II).



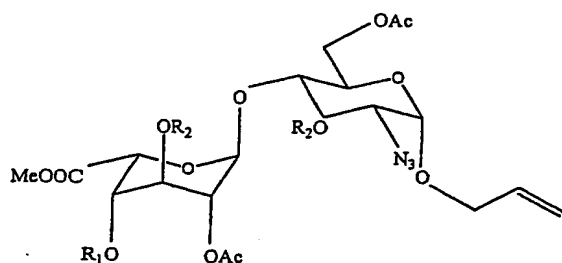
5

(II)

19. Procédé selon la revendication 18, dans laquelle  $R_1$  est un groupe p-méthoxybenzyle et  $R_2$  est un groupe benzyle.

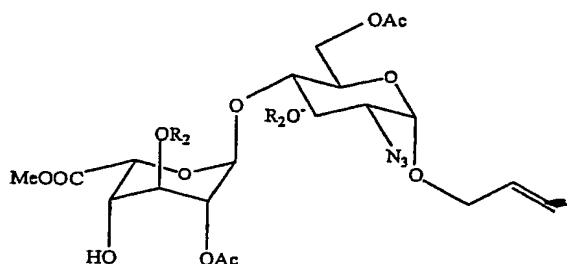
20. Procédé selon la revendication 18, dans lequel le composé soluble dans l'eau précurseur d'oligosaccharides de formule (III) est préparé par les étapes successives suivante :

a) un disaccharide de formule (V) :



(V)

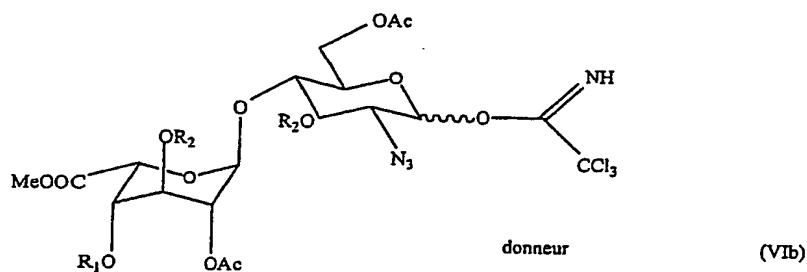
est soumis à un clivage oxydatif du groupement  $R_1$ , de  
 5 préférence, paraméthoxybenzyle, pour donner un disaccharide  
 « accepteur » de formule :



(VIa)

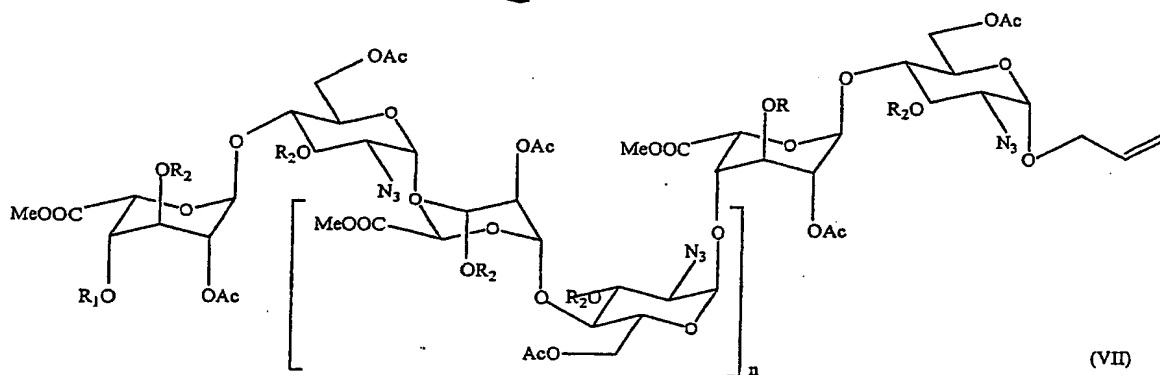
10

b) parallèlement, un disaccharide de formule (V),  
 ci-dessus, est soumis à une isomérisation du groupe allyle  
 en 1-propényle, suivi par une hydrolyse de l'éther d'énol  
 formé et une activation du groupe hydroxyle sous forme de  
 15 trichloroacétamidate pour donner un disaccharide  
 « donneur », de formule (VIb) :



c) on couple le disaccharide accepteur (VIa) et le disaccharide donneur (VIb) pour obtenir le tétrasaccharide ( $n = 0$ ) de formule (VII), qui a une totale stéréospécificité alpha ;

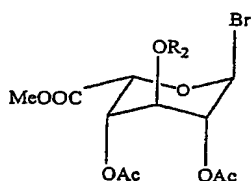
d) éventuellement, on répète les étapes a) à c), en prenant comme produit de départ pour l'étape a), le tétrasaccharide préparé en c), pour obtenir les hexa ( $n = 1$ ) et octa ( $n = 2$ ) saccharide de formule (VII) :



e) éventuellement, on répète les étapes a) à c) en prenant comme produit de départ, pour l'étape a), l'octasaccharide préparée en d), pour obtenir un hexadécasaccharide ( $n = 7$ ) de formule (VII) ;

f) on procède à la désacétylation, réduction de la fonction azide, sulfatation et saponification pour obtenir le composé soluble dans l'eau, précurseur d'oligosaccharide (III) recherché.

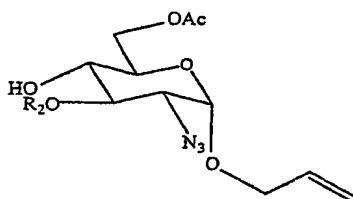
5 21. Procédé selon la revendication 20, dans lequel le disaccharide de formule (V) est préparé par une réaction de couplage entre un composé de formule (VIII) :



(VIII)

10

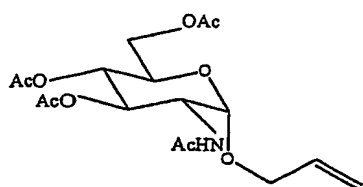
et un composé de formule (IX) :



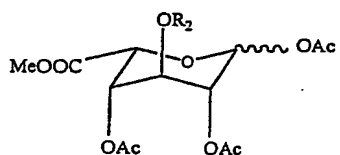
(IX)

15

22. Procédé selon la revendication 21, dans lequel le composé de formule (IX) est préparé à partir du composé de formule (X) et le composé de formule (VIII) est préparé à partir du composé de formule (XI) :



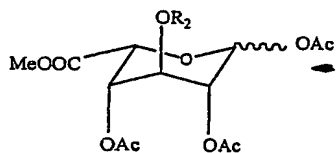
(X)



(XI)

5

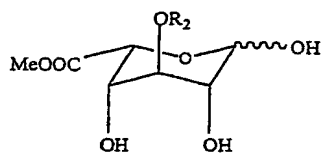
23. Procédé selon la revendication 22, dans lequel le composé de formule :



(XI)

10

est préparé par acétylation du composé de formule (XII) :



(XII)

15

à -40°C dans le dichlorométhane comme solvant, avec de la pyridine comme base, du chlorure d'acétyle comme agent acylant, et de la 4-diméthylaminopyridine comme catalyseur.

24. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, pour une utilisation comme médicament.

5 25. Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, pour préparer un médicament.

26. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, pour une utilisation comme modulateur par exemple inhibiteur, de l'activité de  
10 l'interféron- $\gamma$  endogène ou exogène.

27. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, pour une utilisation dans le traitement des maladies liées à, ou caractérisées par, la présence de cytokines proinflammatoires comme l'Interféron-  
15  $\gamma$  par exemple les maladies auto-immunes inflammatoires ou dégénératives telles que la sclérose multiple, la Glomérulonéphrite, la maladie de Crohn et l'arthrite rhumatoïde.

28. Composé selon l'une quelconque des  
20 revendications 1 à 17 pour une utilisation dans un traitement de complément aux traitements immunosuppresseurs utilisés par exemple pour éviter le rejet de greffes.

29. Médicament contenant un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17.

25 30. Composition contenant le composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une utilisation dans le traitement des maladies liées à, ou caractérisées par, la présence de cytokines proinflammatoires comme  
30 l'interféron- $\gamma$ , par exemple les maladies auto-immunes ou dégénératives telles que la sclérose multiple, la

Glomérulonéphrite, la maladie de Crohn, et l'arthrite rhumatoïde.

31. Composition contenant le composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une utilisation dans un traitement de complément aux traitements immunosuppresseurs utilisés par exemple pour éviter le rejet de greffes.

32. Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, pour préparer un médicament destiné au traitement des pathologies ou troubles reliés à l'activité, notamment excessive, de l'interféron- $\gamma$  endogène ou exogène.

33. Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 pour préparer un médicament destiné au traitement des maladies liées à, ou caractérisées par, la présence de cytokines proinflammatoires comme l'Interféron- $\gamma$ . par exemple les maladies auto-immunes inflammatoires ou dégénératives telles que la sclérose multiple, la Glomérulonéphrite, la maladie de Crohn et l'arthrite rhumatoïde..

34. Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 pour préparer un médicament destiné à un traitement de complément aux traitements immunosuppresseurs utilisés par exemple pour éviter les rejets de greffes.

35. Médicament contenant, outre un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, de l'interféron- $\gamma$ .

36. Médicament selon la revendication 35, dans lequel le composé selon l'une quelconque des revendications

1 à 17 et l' interféron- $\gamma$  se présentent sous la forme d'un complexe du composé et de l' interféron- $\gamma$ .

37. Complexe d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 et d' interféron- $\gamma$  pour une utilisation comme médicament.

38. Complexe d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 et d' interféron- $\gamma$  pour une utilisation comme immunostimulant.

39. Complexe d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 et d' interféron- $\gamma$  pour une utilisation dans le traitement d'une maladie choisie parmi le cancer, les maladies infectieuses par exemple virales, bactériennes ou parasitaires et les fibroses d'organes.

40. Composition contenant un complexe d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 et d' interféron- $\gamma$ , et un véhicule pharmaceutiquement acceptable, pour une utilisation dans le traitement d'une maladie choisie parmi le cancer, les maladies infectieuses, par exemple virales, bactériennes ou parasitaires, et les fibroses d'organes.

41. Médicament contenant un complexe d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 et d' interféron - $\gamma$ .

42. Utilisation d'un complexe d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, et d' interféron  $\gamma$ , pour préparer un médicament.

43. Utilisation d'un complexe d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, et d' interféron  $\gamma$ , pour préparer un médicament destiné au traitement d'une maladie donnée parmi le cancer, les maladies infectieuses,

par exemple virales, bactériennes ou parasitaires, et la fibrose d'organes.

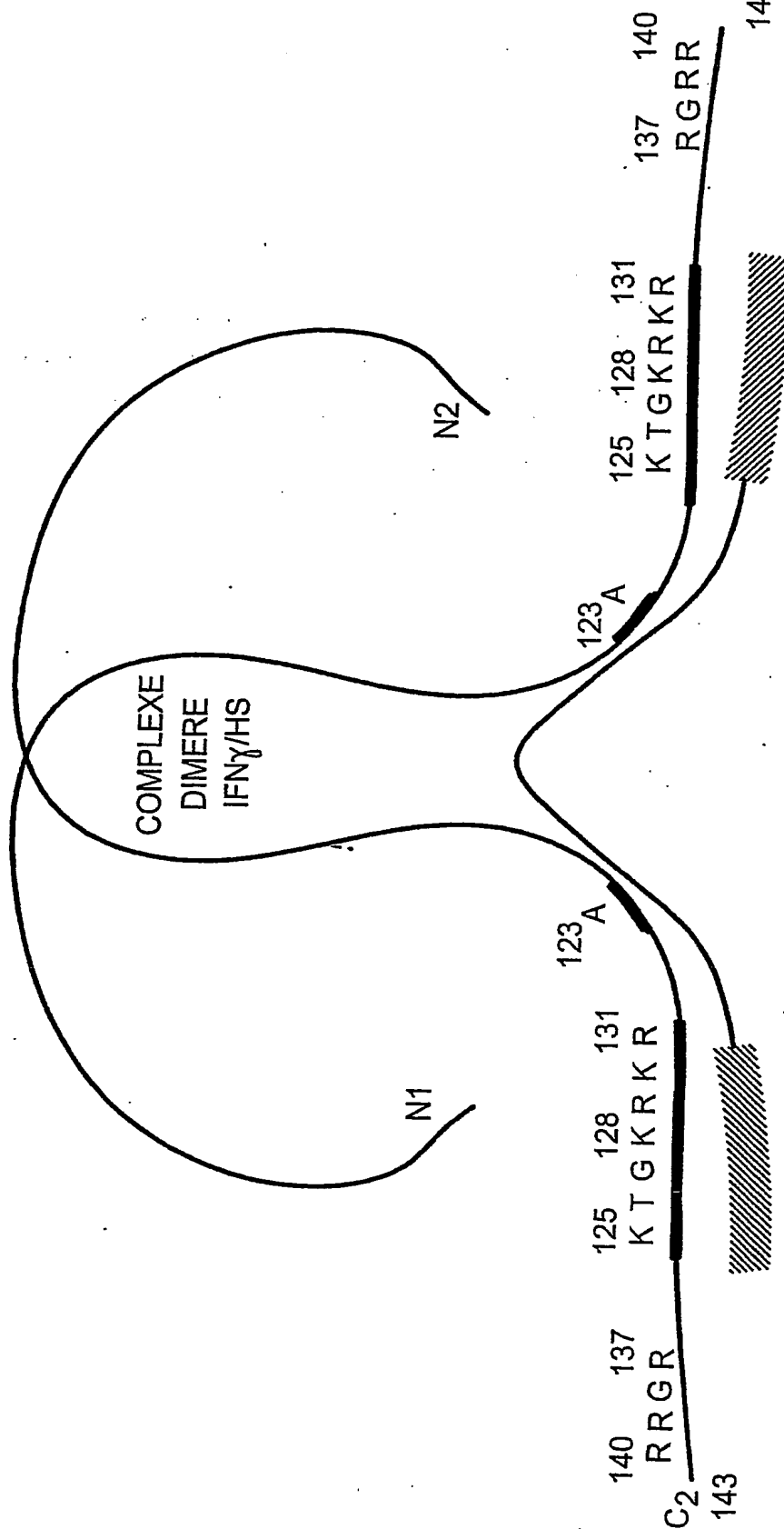


FIG. 1

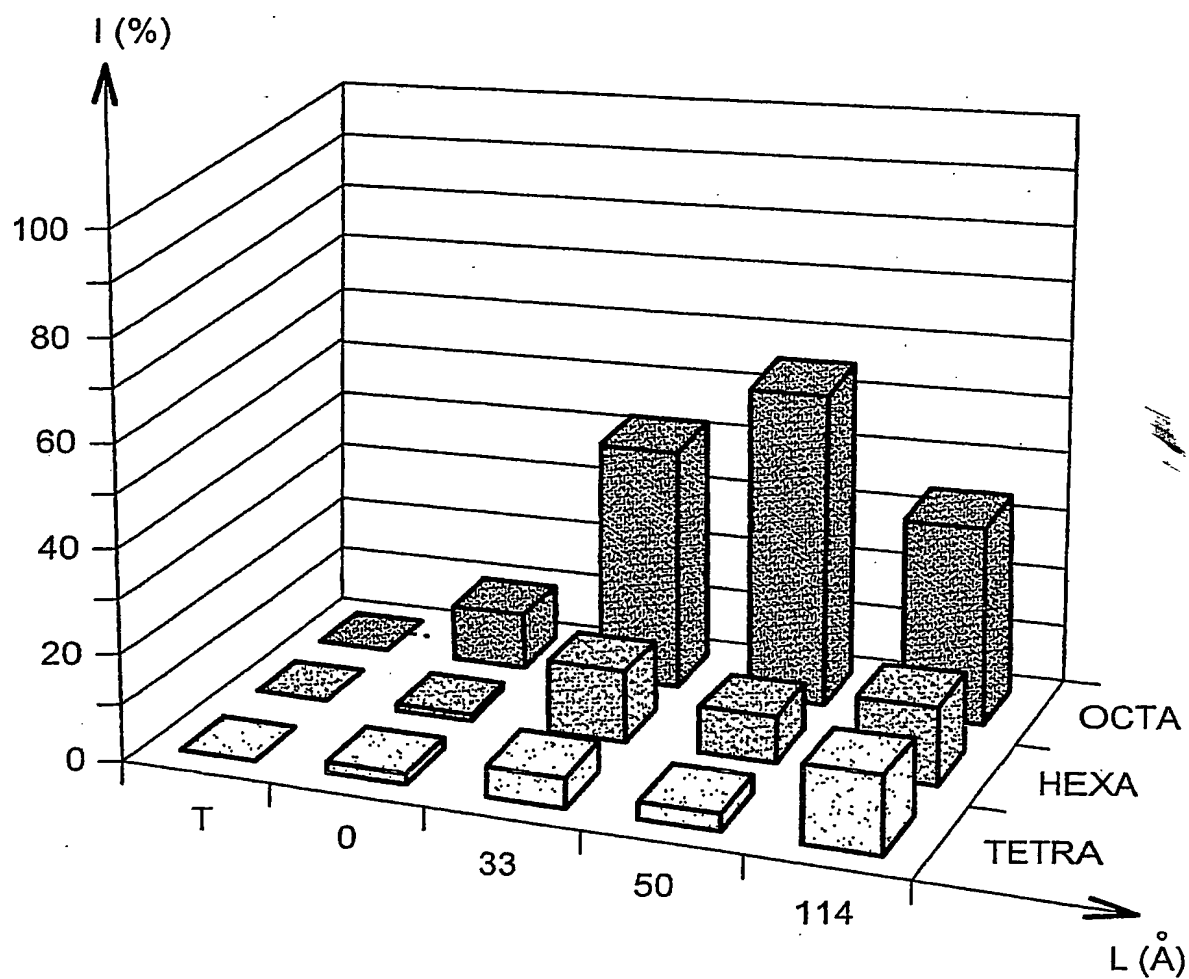


FIG. 2